



FELIPE VENDRAME

EFEITOS DA NIACINA EM CURTO PRAZO SOBRE A CONCENTRAÇÃO  
PLASMÁTICA DE LIPOPROTEÍNAS, TAMANHO DA HDL E FUNÇÃO ENDOTELIAL  
EM INDIVÍDUOS HIPOALFALIPOPROTEINEMICOS

*SHORT-TERM EFFECTS OF NIACIN ON PLASMA LIPOPROTEINS, HDL SIZE AND  
ENDOTHELIAL FUNCTION IN HIPOALPHALIPOPROTEINEMIC INDIVIDUALS*

CAMPINAS  
2014





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

FELIPE VENDRAME

EFEITOS DA NIACINA EM CURTO PRAZO SOBRE A CONCENTRAÇÃO  
PLASMÁTICA DE LIPOPROTEÍNAS, TAMANHO DA HDL E FUNÇÃO ENDOTELIAL  
EM INDIVÍDUOS HIPOALFALIPOPROTEINEMICOS

*SHORT-TERM EFFECTS OF NIACIN ON PLASMA LIPOPROTEINS, HDL SIZE AND  
ENDOTHELIAL FUNCTION IN HIPOALPHALIPOPROTEINEMIC INDIVIDUALS*

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

Master's thesis submitted to the Graduate School of Medical Sciences, State University of Campinas - UNICAMP to obtain the Master Degree in Sciences in the Clinical Medicine

ORIENTADORA: Profa Dra. ELIANA COTTA DE FARIA  
CO-ORIENTADOR: Prof Dr. ANDREI CARVALHO SPOSITO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR  
FELIPE VENDRAME, E ORIENTADO PELA PROFA.  
DR. ELIANA COTTA DE FARIA.

---

Assinatura do Orientador

CAMPINAS  
2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

V553e Vendrame, Felipe, 1988-  
Efeitos da niacina em curto prazo sobre a  
concentração plasmática de lipoproteínas, tamanho da  
HDL e função endotelial em indivíduos  
hipoalipoproteinêmicos / Felipe Vendrame. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Eliana Cotta de Faria.  
Coorientador : Andrei Carvalho Sposito.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Niacina. 2. HDL-colesterol. 3. Endotélio vascular.  
I. Faria, Eliana Cotta de, 1950-. II. Sposito, Andrei  
Carvalho. III. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Short-term effects of niacin on plasma lipoproteins, HDL size and endothelial function in hypoalipoproteinemic individuals

**Palavras-chave em inglês:**

Niacin

Cholesterol, HDL

Endothelium, Vascular

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Mestre em Ciências

**Banca examinadora:**

Andrei Carvalho Sposito [Coorientador]

Eros Antonio de Almeida

Lazaro Alessandro Soares Nunes

**Data de defesa:** 28-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

FELIPE VENDRAME

ORIENTADORA: PROF. DR. ELIANA COTTA DE FARIA

COORIENTADOR: ANDREI CARVALHO SPOSITO

### MEMBROS:

1. PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO



2. PROF. DR. EROS ANTONIO DE ALMEIDA



3. PROF. DR. LAZARO ALESSANDRO SOARES NUNES



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28 de fevereiro de 2014

## **Agradecimentos**

Este espaço é dedicado aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação fosse realizada. Não sendo viável nomeá-los a todos, há no entanto alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero.

A Professora Eliana Cotta de Faria, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao Professor Andrei Carvalho Sposito, meu co-orientador, por me colocar o desafio de trabalhar em conjunto com a cardiologia e desenvolver esta dissertação bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas.

A todos os meus amigos e familiares que de uma forma ou de outra me incentivavam nos momentos difíceis, aos Colegas de Laboratório, especialmente a Eliane, Fernanda, Natalia, Vanessa, Vitor, Isabela, Daniel, Érica, Maria do Carmo e Aparecida o meu muito obrigado pela vossa amizade, companheirismo e ajuda fatores muito importantes na realização desta dissertação e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação. Também meu agradecimento a todo setor de Bioquímica uma referência especial à Mirian, Ilda e Simone, agradeço-lhes a partilha de bons momentos, a ajuda e os estímulos nas alturas de desânimo.

Agradeço a todos os que fazem parte do setor da cardiologia da Unicamp em especial aos Drs. Bruno, Thiago e Valéria, pelo apoio e amizade.

Expresso também a minha gratidão e solidariedade a todos os pacientes que, embora no anonimato, prestaram uma contribuição fundamental para que este estudo fosse possível e para o avanço da investigação científica nesta área do conhecimento.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por fornecer o apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Meus últimos agradecimentos são especiais, ao meu irmão Henrique, pela amizade e compreensão, a distância nunca irá nos separar enquanto apoiarmos um ao outro.

A minha namorada Hanan, que é a única pessoa que realmente sabe as dificuldades que encontrei nestes últimos anos, sempre esteve ao meu lado me apoiando e motivando, a amo do fundo do meu coração.

Por ultimo, e tendo consciência que sozinho não teria sido possível, dirijo um agradecimento especial ao meu pai Dirceu e minha mãe Inez, por serem gigantes em modelos de coragem, humildade, apoio, amizade, incentivo e ajuda na superação de obstáculos que ultrapassei neste período que não foram fáceis.

Agradeço a Deus por poder citar todas estas pessoas neste momento tão importante, obrigada por colocá-las tão caprichosamente em meu caminho. E é a Ele a quem dirijo minha gratidão, por ter me iluminado em todos os momentos de dificuldade.

## Resumo

Baixas concentrações plasmáticas da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) constituem um dos fatores de risco para o desenvolvimento da doença cardiovascular aterosclerótica, a principal causa de morte nos países desenvolvidos e emergentes. A niacina é conhecida por ser o principal fármaco a aumentar as concentrações de HDL-C. A concentração plasmática reduzida das lipoproteínas de alta densidade está associada à vulnerabilidade ao estresse oxidativo e a propensão à disfunção endotelial. A niacina através da ativação de seu receptor específico acoplado à proteína G (GPR109A) promove efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Com base nestas informações, este estudo investigou o efeito de curto prazo da niacina e da niacina associada ao laropiranto sobre a função endotelial, parâmetros séricos bioquímicos e físico-químicos em indivíduos hipoalfalipoproteinêmicos. O estudo foi realizado em 18 indivíduos assintomáticos, de ambos os gêneros com idade entre 20 e 60 anos apresentando concentrações plasmáticas de HDL-C abaixo de 40 mg/dL. Os indivíduos foram tratados com niacina de liberação prolongada 1g/dia (NLE, Metri, Libbs Farmacêutica, São Paulo, Brasil) e niacina associada ao laropiranto 1g/20mg (NLE/LRPT, Cordaptive, Merck, São Paulo, Brasil), em um estudo *crossover* e a sequência de tratamentos foi realizada de forma aleatória. As amostras de plasma e a dilatação fluxo mediada da artéria braquial (FMD) foram obtidas no início do estudo, no 7º dia do tratamento 1, no 7º dia após *washout* e no 7º dia do tratamento 2. Após terapias com NLE e NLE/LRPT as concentrações de triglicérides diminuíram 4,0% e 3,0% ( $p < 0,05$ ) e o tamanho da HDL 5,8% e 6,2%, ( $p < 0,05$ ) além de aumentarem a glicose 5,0 e 8,0 % ( $p < 0,02$ ) e a bilirrubina direta 62% e 50% ( $p < 0,04$ ); também foi observado aumento médio do FMD de 4,5% e 4,1% nos grupos NLE e NLE/LRPT, respectivamente. Não houve alteração de HDL-C e na atividade da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) após ambos os tratamentos. Todas estas modificações foram revertidas após o período de *washout*. Na análise intergrupos, não houve diferenças em relação à variação de HDL-C, triglicérides, proteína C



reativa, bilirrubina direta e FMD. Os resultados revelam que a terapia de niacina de curto prazo pode melhorar a função endotelial em indivíduos com baixas concentrações de HDL-C. A adição do antagonista de PGD2 (Iaropiranto) não influenciou o efeito da niacina sobre a função endotelial.

## Abstract

Low plasma levels of high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) are one of the risk factors involved in the development of atherosclerotic cardiovascular disease, the main cause of death in developed and emerging countries. Niacin is known as the main drug used to increase HDL-C levels. Reduced concentrations of high density lipoproteins are associated to oxidative stress vulnerability and tendency to endothelial dysfunction. Niacin, through the activation of its specific receptor coupled to G protein (GPR109A) promotes anti-inflammatory and antioxidant effects. Therefore, this study investigated the short-term effect of niacin and niacin associated to laropiprant on endothelial function, biochemical and physical-chemical serum parameters, in hypoalphalipoproteinemic subjects. The study was carried out in 18 asymptomatic subjects, male and female, aged between 20 and 60 years, with HDL-C plasma concentrations below 40 mg/dL. Subjects were treated with extended-release niacin 1g/day (NLE, Metri, Libbs Pharmaceutics, Sao Paulo, Brazil) and niacin associated to laropiprant 1g/20mg (NLE/LRPT, Cordaptive, Merck, Sao Paulo, Brazil), in a crossover study. The sequence of treatments was randomly determined. Plasma samples and flow-mediated dilatation of the brachial artery (FMD) were obtained in the beginning of the study, on the 7<sup>th</sup> day of treatment 1, on the 7<sup>th</sup> after washout and on the 7<sup>th</sup> day of treatment 2. After therapies with NLE and NLE/LRPT respectively, triglycerides (TG) concentrations decreased 4,0% and 3,0% ( $p < 0,05$ ) and HDL size 5,8% and 6,2%, ( $p < 0,05$ ); besides, glucose increased 5,0 and 8,0 % ( $p < 0,02$ ) and direct bilirubin 62% and 50% ( $p < 0,04$ ). The average increase of FMD was 4,5% and 4,1% on NLE and NLE/LRPT groups, respectively. No changes in HDL-C and the activity of cholesteryl ester transfer protein (CETP) after both treatments were observed. All these changes were reversed after the washout period. In intergroup analysis, no differences were found regarding variations in HDL-C, triglycerides, C reactive protein (CRP), direct bilirubin and FMD. These results suggest that short-term niacin therapy may improve endothelial function in subjects with low HDL-C

concentrations. The addition of the PGD2 antagonist (laropiprant) did not influence niacin's effect on endothelial function.

## **Sumário**

1. Introdução	19
1.1 Lipoproteínas plasmáticas, metabolismo, hipoalfalipoproteinemia	20
1.2 Aterogênese, função e disfunção endotelial	26
1.3 Métodos <i>in vivo</i> de medida da função endotelial	33
1.4 Niacina e laropiranto	37
1.4.1 Ação da niacina em lípidos	39
1.4.2 Ação da niacina independente de lípidos	41
1.4.3 Efeitos colaterais da niacina	44
1.4.4 Niacina em estudos de longo e curto prazo	46
1.5 Questões que motivaram o estudo	49
2. Objetivos	50
3. Capítulo	52
4. Conclusão	65
5. Referências	67

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1-</b> Composição química das principais lipoproteínas	20
<b>Tabela 2-</b> Doenças genéticas relacionadas à hipoalfalipoproteinemia	26
<b>Tabela 3-</b> Dados históricos da niacina	37
<b>Tabela 4-</b> Expressão do receptor da niacina GPR109A (HCA2)	38

## Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b> Estágios do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas	29
<b>Figura 2-</b> Avaliação da dilatação fluxo mediada da artéria braquial	36
<b>Figura 3-</b> Estrutura química da niacina	37
<b>Figura 4-</b> Mecanismos de ação da niacina no fígado	40
<b>Figura 5-</b> Efeitos da niacina sobre a aterosclerose independente da modificação lipídica no plasma	42
<b>Figura 6-</b> Mecanismos pelos quais a niacina induz o <i>flushing</i> cutâneo	45

## Lista de abreviaturas

<b>ABCA1 -</b>	Transportadores cassete de ligação a ATP, sub-família A, membro 1/ <i>ATP-binding cassette, sub-family A, member 1</i>
<b>ABCA4 -</b>	Transportadores cassete de ligação a ATP, sub-família A, membro 4/ <i>ATP-binding cassette, sub-family A, member 4</i>
<b>ABCG1 -</b>	Transportadores cassete de ligação a ATP, sub-família G, membro 1/ <i>ATP-binding cassette sub-family G, member 1</i>
<b>AG -</b>	Ácidos graxos
<b>AIM-HIGH -</b>	<i>Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcomes</i>
<b>AINES -</b>	Anti-inflamatórios não esteroidais
<b>Akt -</b>	Proteína quinase B
<b>AMPK -</b>	<i>Proteína quinase ativada por AMP/ AMP-activated protein kinase</i>
<b>Apo AI -</b>	Apolipoproteína AI
<b>Apo B100 -</b>	Apolipoproteína B100
<b>Apo B48 -</b>	Apolipoproteína B48
<b>Apo CII -</b>	Apolipoproteína CII
<b>Apo CIII -</b>	Apolipoproteína CIII
<b>Apo E -</b>	Apolipoproteína E
<b>BART -</b>	Teste de reatividade da artéria braquial
<b>CCR2 -</b>	Receptor quimiotático tipo 2
<b>CE -</b>	Colesteril éster
<b>CETP -</b>	Proteína de transferência de colesteril éster
<b>CL -</b>	Colesterol livre

<b>COX -</b>	Ciclooxigenase
<b>DAC -</b>	Doença arterial coronariana
<b>DCVs -</b>	Doenças cardiovasculares
<b>DGAT2 -</b>	Diacylglicerol aciltransferase 2
<b>EDHF -</b>	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
<b>eNOS -</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>EROS -</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ET-1 -</b>	Endotelina-1
<b>FL -</b>	Fosfolípidos
<b>FMD -</b>	Dilatação fluxo mediada
<b>GPR109A -</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>HCA2 -</b>	Ácido hidroxicarboxílico receptor 2
<b>HDL -</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HO-1 -</b>	Hemeoxigenase 1
<b>HOCL -</b>	Ácido hipoclorídrico
<b><i>HPS2-THRIVE -</i></b>	<i>The Heart protection Study 2 - Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events</i>
<b>ICAM-1 -</b>	Molécula de adesão intracelular
<b>IDL -</b>	Lipoproteínas de densidade intermediária
<b>IL-1 -</b>	Interleucina 1
<b>LCAT -</b>	Lecitina-colesterol aciltransferase
<b>LDL -</b>	Lipoproteínas de baixa densidade
<b>LDLox -</b>	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
<b>LE -</b>	Lipase endotelial
<b>LH -</b>	Lipase hepática



<b>Lp(a) -</b>	Lipoproteína (a)
<b>LPL -</b>	Lipoproteína lipase
<b>LRP -</b>	Receptor da lipoproteína
<b>MCP-1 -</b>	Proteína quimiotática de monócitos 1
<b>MMPs -</b>	Metaloproteinases
<b>NAD -</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NADP -</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b><i>NADP oxidase</i> -</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
<b><i>NF-K<math>\beta</math></i> -</b>	Fator nuclear kappa- $\beta$
<b>NLE -</b>	Niacina de liberação estendida
<b>NLE/LRPT -</b>	Niacina de liberação estendida associada ao laropipranto
<b>NO -</b>	Óxido nítrico
<b>O<sup>2-</sup> -</b>	Ânion superóxido
<b>OH -</b>	Radical hidroxila
<b>ONOO- -</b>	Peroxinitrito
<b>PCAM1 -</b>	Molécula de adesão celular endotelial
<b>PGD2 -</b>	Prostaglandina D2
<b>PGE2 -</b>	Prostaglandina E2
<b>PGH2 -</b>	Prostaglandina H2
<b>PGI2 -</b>	Prostaciclina
<b>PI3K -</b>	Fosfatidilinositol 3-quinase
<b>PLTP -</b>	Proteína de transferência de fosfolípidos
<b>PON -</b>	Paraoxanase
<b>PPAR <math>\gamma</math> -</b>	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos $\gamma$ / <i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>

<b>QM -</b>	Quilomícrons
<b>S1P -</b>	Esfingosina-1-fosfato
<b>S1P3 -</b>	Receptor de S1P
<b>SR-B1 -</b>	Receptor <i>scavenger</i> de classe B, tipo 1/ <i>Scavenger receptor class B, member 1</i>
<b>TG -</b>	Triglicérides
<b>TNF<math>\alpha</math> -</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TRC</b>	Transporte reverso de colesterol
<b>TXA2 -</b>	Tromboxano A2
<b>usPCR -</b>	Proteína C reativa ultra sensível
<b>VCAM-1 -</b>	Molécula de adesão vascular-1
<b>VLDL -</b>	Lipoproteínas de muito baixa densidade

## INTRODUÇÃO

---

## 1.1 LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS, METABOLISMO, HIPOALFALIPOPROTEINEMIA

As lipoproteínas são agregados macromoleculares heterogêneos quanto ao tamanho, volume, forma, composição, função, densidade, mobilidade eletroforética e talvez o mais importante, à sua contribuição para a doença cardiovascular (1). De forma geral, são compostas por um núcleo central de lípidos hidrofóbicos em proporções variadas e apolipoproteínas (Apos) que condicionam diversas funções, como a formação das partículas lipoproteicas (Apos B100 e B48), o transporte de lípidos no plasma, a ligação com receptores de membrana (Apos B100 e E), ou cofatores enzimáticos (Apos CII, CIII e AI) (1, 2).

As lipoproteínas são classificadas em dois grupos, as ricas em triglicérides (TG), pobres em proteínas e menos densas, representadas pelos quilomícrons (QM) e pelas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*) e as ricas em colesterol, menores, que contém mais proteínas, são mais densas e compreendem as de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*) e as de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*). A lipoproteína de densidade intermediária (IDL, do inglês *intermediate density lipoprotein*) é um produto intermediário na formação da LDL (1). A tabela 1 apresenta em detalhes a composição química das principais lipoproteínas séricas.

**Tabela 1-** Composição química das principais lipoproteínas plasmáticas (Quintão e colaboradores) (1)

	Lípides (%)					Proteínas (%)	Apolipoproteínas
	CE	CL	TG	FL	Total		
<b>QM</b>	1-3	0,5-1	86-94	3-8	98-99	1-2	B-48; C; E
<b>VLDL</b>	12-14	6-8	55-65	12-18	89-94	5-10	B-100; C; E
<b>LDL</b>	35-40	5-10	8-12	20-25	75-80	20-24	B-100
<b>HDL</b>	14-18	3-5	3-6	20-30	50-55	45-50	A-I; A-II; E

**Legenda:** Composição das lipoproteínas quanto à lípidos e proteínas, expressos em (%) e apolipoproteínas envolvidas. QM = Quilomícrons; VLDL= Lipoproteína de muito baixa densidade; LDL= Lipoproteína de baixa densidade; HDL= Lipoproteína de alta densidade. A composição consiste de CE= colesterol éster, CL= colesterol livre TG= triglicérides e FL= fosfolípidos.

Duas vias estão envolvidas no metabolismo das lipoproteínas: a intestinal e a hepática. A via intestinal tem início com a atividade das lipases, principalmente a pancreática, que hidrolisa os TG provenientes da dieta. Os ácidos graxos (AG) liberados são absorvidos pelos enterócitos e então reagrupados em TG, incorporados aos QM formando grandes lipoproteínas ricas em TG e contendo Apo B48, que uma vez expostos à lipoproteína lipase (LPL) nos tecidos adiposo e muscular tem os TG hidrolisados, resultando na liberação de AG. O fígado por sua vez ativamente remove da circulação os remanescentes de QM (3).

Já na via hepática, os TG sintetizados no fígado são transportados na partícula de VLDL, que realiza o transporte de TG do fígado para os tecidos periféricos (3). A IDL é gerada a partir da VLDL, por ação das enzimas LPL e lipase hepática (LH) durante o processo de lipólise (4).

As partículas remanescentes de VLDL, LDL e QM, após enriquecimento com CE, são fragmentadas e endocitadas nos hepatócitos por meio de receptores específicos, como o receptor de LDL, "*Lipoprotein-related Receptor*" (LRP) (5).

A formação da HDL se inicia a partir da secreção de Apo AI, que ocorre principalmente no fígado e no intestino. Após sua secreção, a Apo AI começa a receber fosfolípidos e colesterol livre via receptor *ATP-binding Cassette Transporter type 1* (ABCA1), formando então as pré- $\beta$  HDLs, partículas discoidais pobres em lípidos que rapidamente se tornam HDLs maduras, devido ao enriquecimento gradual em CL e FL via ABCA1 (6, 7). Além disso, através da ação da Lecitina Colesterol Acil Transferase (LCAT) o CL é esterificado e interiorizado na partícula pelo seu caráter hidrofóbico, o que contribui para a modificação estrutural e aumento de tamanho da partícula. O processo de aquisição de CL continua via transportadores *ATP-binding Cassette Transporter subfamily G1* (ABCG1); a HDL<sub>3</sub> forma a HDL<sub>2</sub>, que é uma partícula maior e menos densa por ser mais rica em lípidos.

Outras enzimas também atuam na maturação e remodelamento da HDL. A proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) transfere FL e CL de partículas ricas em TG para HDL. A lipase hepática (LH) por sua vez remodela a HDL por hidrólise dos TG e fosfolípidos, enquanto a lipase endotelial (LE) hidrolisa os fosfolípidos da HDL. Assim, uma variedade de enzimas transforma a HDL à medida que circulam através do plasma (7).

A remoção do colesterol éster das partículas de HDL pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na forma direta, o colesterol da HDL<sub>2</sub> é captado seletivamente no fígado, gônadas e adrenais via SR-BI (*Scavenger Receptor Class B Type I*) (8). Já na forma indireta, o colesterol éster é transferido da HDL para lipoproteínas contendo apo B (principalmente LDL e VLDL) via ação da CETP (proteína de transferência de colesterol éster) (8, 9).

Uma das principais funções antiaterogênicas da HDL é o transporte reverso do colesterol (TRC). Resumidamente, o TRC inicia-se com a remoção do colesterol dos tecidos periféricos, seguida da esterificação deste pela LCAT; da transferência de CE para lipoproteínas ricas em Apo B pela CETP, com posterior captação por receptores B-E no fígado e captação seletiva de CE das HDL pelos receptores SR-BI (7, 8).

Além do TRC, a HDL tem outras funções importantes, que incluem: ação antioxidante, inibição da inflamação, a regulação da atividade antitrombótica e a atividade vasodilatadora (10).

O papel antioxidante da HDL pode ser observado quando há aumento da concentração de LDL ou do seu tempo de permanência na circulação sanguínea, facilitando sua modificação química, em especial a oxidação, tornando-a uma partícula pró-inflamatória (11). A HDL limita a oxidação da LDL por diversos mecanismos, promovidos pela ação de proteínas, enzimas e outras moléculas encontradas na HDL, dentre as quais se destacam: paraoxonase (PON), fosfolipase A-2 associada à lipoproteína, glutathione-peroxidase,  $\alpha$ -tocoferol, licopeno, estrógenos, e as propriedades antioxidantes da Apo AI e Apo AII (12, 13).

A HDL pode reduzir a concentração de partículas oxidadas de LDL através da inibição da migração leucocitária intimal, limitando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), a transferência dos lípides oxidados da LDL para a HDL, a inibição da atividade do Fator Nuclear Kappa-B (NF-κB), atenuando a síntese da NADP-oxidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) (13, 14).

Vários são os mecanismos pelos quais a HDL é capaz de inibir o processo inflamatório na parede arterial. Por sua natureza central na ativação da resposta inflamatória, julga-se como principal a inibição da ativação do fator de transcrição NF-κB (15, 16). Com essa inibição, a HDL pode atenuar a síntese de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral, interleucinas 6 (IL-6) e de moléculas de adesão como a E-selectina, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*). Em paralelo, a HDL pode atenuar a atividade inflamatória por seu efeito antioxidante, pela ligação direta a lipopolissacarídeos, pelo aumento da síntese de óxido nítrico (NO) e ativação das vias fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e Akt, cálcio/calmodulina quinase, proteína quinase C e mitógeno proteína quinase p38 (17).

Além disso, a composição das partículas da HDL influencia diretamente sua interação com o sistema imuno-inflamatório. O aumento do conteúdo de TG, por exemplo, tem associação direta com a atividade inflamatória sistêmica (18).

Os mecanismos moleculares da atividade vasodilatadora da HDL têm início com a ativação da produção de NO, molécula de sinalização que induz o relaxamento da musculatura lisa das artérias que envolvem a ligação com o receptor SR-BI, um evento iniciador presente em ambas as células, endoteliais e progenitoras endoteliais (19-21).

O NO é gerado na conversão enzimática do aminoácido L-arginina em L-citrulina em uma reação catalisada pelo complexo enzimático óxido nítrico sintase (NOS). Existem 3 isoformas de NOS: a endotelial, que além do endotélio também é expressa em músculo

cardíaco e plaquetas e dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, e as isoformas constitucional e induzível (22). A regulação do NO ocorre pela expressão da NOS, atividade desta e/ou degradação do NO. Sua produção e catabolismo são elementos essenciais para a modulação da vasorregulação e controle do fluxo e resistência arterial pelo endotélio (23). Os produtos finais de degradação do NO *in vivo* são nitritos e nitratos.

A HDL aumenta a produção de NO através da ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em células endoteliais, ativando as cascatas de sinalização intracelular. Esta atividade vasodilatadora envolve a interação da apo AI da HDL com o receptor SR-BI e receptores de esfingosina 1-fosfato, seguidos por eventos intracelulares, como a interação de PDZK1 com SR-BI e a ativação das proteínas quinases Akt, AMPK e ERK. Em particular, a subclasse de receptores S1P3 e S1P podem mediar a ativação de eNOS (24, 25).

As subclasses S1P2 e S1P3 estão envolvidas nos efeitos estimulantes da S1P na proliferação de células endoteliais, mediado por Akt/ERK/NO (26). O receptor S1P2 também pode ser ativado por S1P nas células do músculo liso, resultando em um crescimento celular suprimido nas artérias. S1P associada à HDL pode, assim, regular o desenvolvimento neointimal (27). Além disso, o S1P pode estar envolvido na estimulação da produção de prostaciclina pelas HDLs, regulando a ciclooxigenase-2 em células do músculo liso mediado pelos receptores S1P2 e S1P3 (28).

Outra via envolvida na manutenção da atividade da eNOS e relaxamento dependente do endotélio pela HDL, é mediada por ABCG1 e envolve o efluxo celular de colesterol livre e 7 ketocolesterol (7K) através deste receptor (28, 29). O efluxo de 7-ketocolesterol impede a produção de EROS em uma forma dependente de ABCG1, preservando assim, a atividade e a biodisponibilidade da eNOS e melhorando a atividade vascular (29). A indução da produção de NO mediada pelo ABCG1 pode envolver a regulação negativa da influência inibidora de caveolina-1 em eNOS (30).



Outro componente proteico da HDL potencialmente envolvido na vasodilatação é representado pela Paraoxonase-1 (PON1). A inibição da atividade de PON1 impede a capacidade da HDL para estimular a Akt, produção de NO endotelial e a vasodilatação dependente de NO (31).

Outros lípidos da HDL, capazes de realizar o relaxamento endotelial incluem o estradiol e androsterona. A HDL associada ao estradiol estimula o relaxamento do endotélio através da indução da eNOS (32), um efeito que pode ser ligado ao colesterol, acelerando o efluxo (33). A dehidroepiandrosterona é um potente relaxante vascular presente na HDL, na forma de ésteres de ácidos graxos e os seus derivados lipofílicos. Tais ésteres de ácidos graxos de dehidroepiandrosterona, podem induzir eNOS endotelial, levando ao relaxamento vascular (34).

A heterogeneidade da HDL sugere que os seus efeitos vasodilatadores estejam especificamente associados com subpopulações de HDLs (35). A indução da produção de NO por HDL envolve a interação com os receptores de S1P (24, 36), e as partículas de HDL<sub>3</sub>, pequenas e densas, estão enriquecidas por S1P, e podem ser críticas para a vasodilatação dependente de HDL (37, 38), pois estimulam a secreção de prostaciclina pelas células endoteliais e se mostram mais eficazes em comparação as partículas de HDL<sub>2</sub> (39). Em contrapartida, grandes partículas de HDL interagem com ABCG1, podendo ter contribuição fundamental para a vasodilatação mediada pelo efluxo do colesterol através deste receptor (40).

A redução da concentração plasmática de HDL (hipoalfalipoproteinemia) constitui um fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose, sendo desejável que o colesterol da HDL seja igual ou maior que 60mg/dL, segundo a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (41). A hipoalfalipoproteinemia pode ser definida como o valor de corte igual ou menor que o percentil 10 da concentração plasmática de HDL-C em população assintomática (42), sendo classificada em duas formas: primária e secundária, sendo esta última a mais prevalente e frequentemente associada à hipertrigliceridemia (43).

Em relação às causas primárias, são comuns desordens genéticas que cursam com a diminuição da produção, aumento na captação hepática ou aumento da metabolização da HDL (44). As doenças mais comuns estão apresentadas na tabela 2 (44, 45).

**Tabela 2-** Doenças genéticas relacionadas à hipoalfalipoproteinemia

Doença	Gene	Herança	Frequência na população	HDL-C (mg/dL)
Hipoalfalipoproteinemia familiar	Desconhecido	A, D	1/400	20 a 30
Deficiência familiar de Apo AI e Apo CIII	Apo AI ou Apo CIII	A, R	Rara	5
Deficiência de LCAT	LCAT	A, R	Rara	10
Doença do olho de peixe	LCAT	A, R	Rara	10
Doença de <i>Tangier</i>	ABCA1	A, R	Rara	5

**Legenda:** A- Autossômica, D- Dominante e R- Recessiva.

Como causas secundárias de hipoalfalipoproteinemia são inclusos: a obesidade, síndrome metabólica, sedentarismo, diabetes tipo dois, tabagismo, doença renal terminal, hipertrigliceridemia, o tratamento com andrógenos ou progesterona, o uso de altas doses de diuréticos tiazídicos, doença hepática grave, má absorção, desnutrição e doença inflamatória grave (46).

Algumas terapias não farmacológicas auxiliam no aumento das concentrações de HDL, entre elas: a dieta que deve ser balanceada, a diminuição de peso corporal, exercícios aeróbicos e a extinção do tabagismo, podendo os dois últimos aumentar o HDL-C de 5 à 10 mg/dL (47). Relatos de tentativas de elevar o HDL-C estão se tornando cada vez mais frequentes na literatura e alguns estudos concordam que o aumento do HDL deve ser um dos objetivos no tratamento das dislipidemias para a redução de risco de doença coronariana (46).

## 1.2 ATEROGÊNESE, FUNÇÃO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.

As doenças cardiovasculares (DCVs) representam a principal causa de morte em países desenvolvidos e vem aumentando rapidamente nos países em desenvolvimento (48). Estima-se que até 2030 as mortes causadas pelas DCVs, principalmente cardíacas e acidentes vasculares cerebrais, cheguem a 23,3 milhões de casos, se mantendo como a primeira causa de morte mundial (48, 49).

Um dos avanços da medicina foi o da identificação dos principais fatores de risco para DCVs, através de grandes estudos prospectivos, como por exemplo, o *Framingham Heart Study* (50) e *Seven Countries Study* (51). O controle dos principais fatores de risco modificáveis, tais como o diabetes mellitus, a hipertensão arterial, as dislipidemias e o tabagismo, representa uma considerável redução na morbidade e mortalidade associada às DCVs, e a aterosclerose é o principal processo patológico subjacente da doença cardiovascular (52).

As artérias contêm três camadas: a camada interna (também chamada de íntima), revestida por uma monocamada de células endoteliais que está em contato com o sangue que recobre a membrana basal. A camada média, ou túnica média, contém células musculares lisas envolvidas em uma matriz extracelular complexa. A camada adventícia, delimitada internamente pela lâmina elástica externa e externamente pelo tecido conjuntivo contém mastócitos, algumas células musculares lisas, terminações nervosas e microvasos (Figura 1-A) (53).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (53).

Para Jawien (54), a presença da disfunção endotelial, somada a desproporção entre lipoproteínas ateroprotetoras e aterogênicas no plasma, é um dos fatores mais importantes para o estabelecimento da aterosclerose, em resposta à perda de homeostasia local e estímulo à resposta inflamatória crônica. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a

permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial (53).

Retida no espaço subendotelial, a LDL é oxidada por radicais livres e torna-se imunogênica, gerando produção crescente de EROS por células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas do vaso (7, 54). A LDL oxidada (LDLox) também pode favorecer a formação de nitratos peróxidos, que resultam em menor disponibilidade de NO (23).

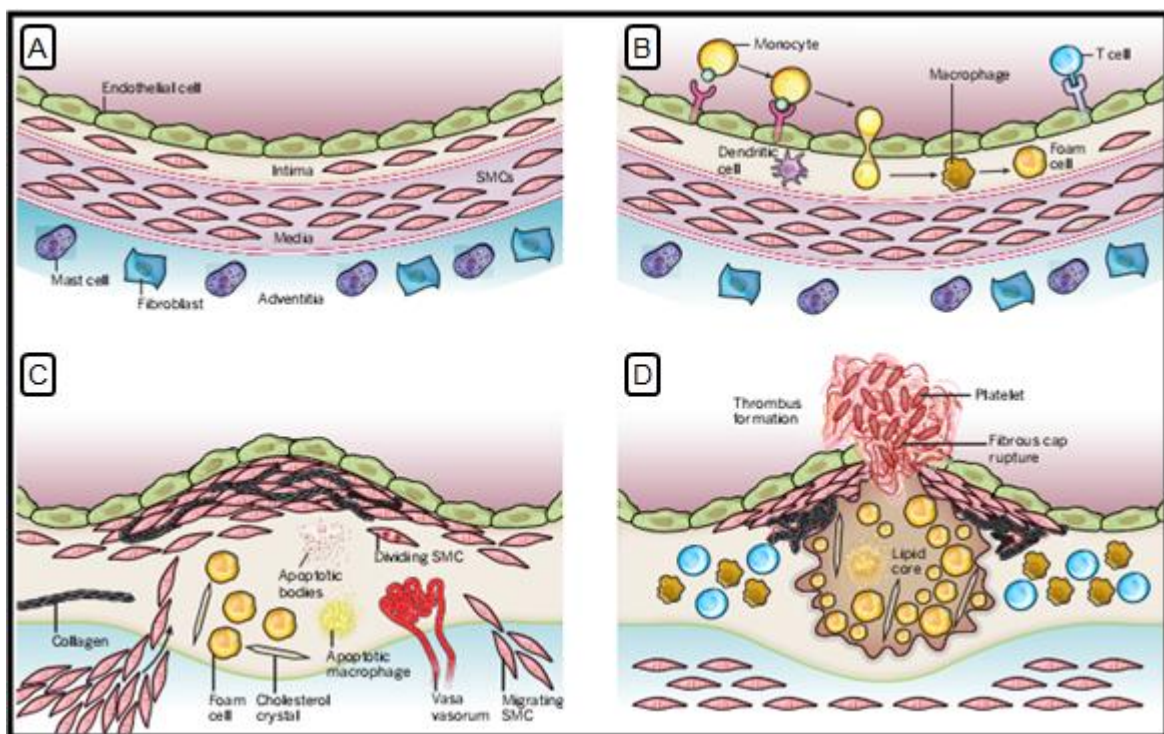
O endotélio vascular resiste prolongadamente ao contato com os leucócitos circulantes, incluindo os monócitos. Quando as células endoteliais sofrem dano, regulam positivamente a expressão de vários tipos de moléculas de adesão leucocitária (55), dentre esta a VCAM-1, que se liga principalmente a leucócitos (macrófagos) envolvidos no início do desenvolvimento do ateroma. Em resposta ao acúmulo de lipoproteínas oxidadas, estas possuem constituintes como fosfolípidos oxidados ou aldeídos de cadeia curta, que induzem a ativação transcricional de VCAM, mediada em parte pelo NFkB. Além disso, citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) ou fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) também atuam nesta via (56).

Uma vez aderidos à camada endotelial, os monócitos passam para a camada íntima arterial, e esta migração depende da presença de um gradiente quimiotático. Assim, quimiocinas participam deste processo, principalmente através da interação da MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) com o seu receptor quimiotático para leucócitos (receptor quimiotático tipo 2 (CCR2)). Uma vez na camada íntima, os macrófagos expressam receptores *scavenger*, que captam as partículas de LDL modificadas por oxidação ou glicação. A partir deste processo são formadas as células espumosas, que secretam citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pelo aumento da resposta inflamatória local, bem como a produção de EROS (Figura 1-B) (55).

Mediadores de inflamação estimulam à migração e a proliferação das células musculares lisas da camada média, que ao migrarem para a íntima, passam a produzir citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular, formando a capa fibrosa da placa

aterosclerótica. Esta, portanto, é formada por elementos celulares, componentes de matriz extracelular e núcleo lipídico (Figura 1-C). A placa aterosclerótica pode ser estável onde o colágeno é predominante, células inflamatórias são escassas e o núcleo lipídico é menor, ou instável, onde apresenta intensa atividade inflamatória, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa tênue. A produção de metaloproteinases (MMPs) pode degradar a estrutura da matriz extracelular que dá sustentação à capa fibrosa, e o seu rompimento expõe o núcleo lipídico altamente trombogênico, permitindo o contato do sangue com produtos dos macrófagos no interior do ateroma, como por exemplo, o fator tecidual, levando à ruptura da placa e formação de trombo (Figura 1-D). As plaquetas ativadas pela presença de trombina proveniente da cascata de coagulação estimulam a formação do trombo (54, 55).

Eventos clínicos como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral podem ocorrer a partir da ruptura das placas instáveis, nas quais o trombo pode ocluir a luz do vaso e interromper o fluxo sanguíneo (57).



**Figura 1-** Adaptado de Libby e colaboradores 2011. Estágios do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. A- Artéria normal com três camadas intactas, B- Passo inicial da aterosclerose, adesão de leucócitos para a monocamada endotelial, C- Progressão da lesão e apoptose celular, D- Complicações finais da aterosclerose, podendo ocorrer ruptura do vaso (53).

A ausência de fatores de risco “tradicionais” não protege completamente contra o desenvolvimento da aterosclerose, e novos fatores têm sido identificados, como os marcadores inflamatórios (58). Segundo Libby e colaboradores (59), entre vários biomarcadores de inflamação propostos para o uso em diagnóstico, destacam-se as mieloperoxidases, fosfolipase A2, citocinas como a interleucina-6 (IL-6) e a proteína C reativa, medida por método ultra sensível (usPCR). Esta última tem merecido considerável atenção, por uma variedade de razões, dentre elas, em indivíduos saudáveis sem infecções agudas ou doenças inflamatórias, os níveis de usPCR permanecem estáveis por longos períodos, e ainda, tem uma estabilidade química elevada além de não requerer precauções especiais no processamento.

O endotélio vascular, já foi considerado uma mera barreira seletiva e permeável entre o fluxo sanguíneo e a parede vascular (60), e através de contínuos estudos nas últimas décadas, foi reconhecido como uma camada monocelular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, estrategicamente situados entre a circulação e o restante da parede vascular, constituindo uma interface ativa, cujas funções são integradas por um complexo sistema de mediadores químicos (61-63).

Para Batlouni (60), o endotélio intacto controla a permeabilidade vascular, regulando o tráfego de moléculas e inclusive de células; além disso, segundo Higashi e colaboradores (64), o mesmo constitui uma interface não trombogênica entre o vaso e os componentes sanguíneos, mantém a fluidez do sangue e modula a vasomotricidade, ajustando o calibre dos vasos às constantes alterações hemodinâmicas e humorais locais e a própria estrutura vascular.

O endotélio pode ser considerado um verdadeiro sistema autócrino, parácrino e endócrino do organismo humano, que responde a vários estímulos, produzindo e secretando um grande número de compostos metabolicamente ativos, além de modular ou inibir os efeitos

de substâncias circulantes. Sua integridade é essencial à regulação do tônus vascular, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e à proteção contra trombose e a própria aterogênese (65).

As células endoteliais executam sua função homeostática, através da capacidade de percepção das alterações nas forças hemodinâmicas e mediadores produzidos localmente ou circulantes, e a resposta a estas alterações pela produção de um número de fatores biologicamente ativos, através de sua capacidade de sintetizar e secretar um amplo espectro de substâncias antiaterogênicas. As células endoteliais estimulam a formação de novas células e vasos sanguíneos e a reparação dos vasos danificados (66, 67).

Wajchenberg, (66) Higashi e colaboradores (64) explicam que os fatores derivados do endotélio podem modificar profundamente a função plaquetária, bem como o estado contrátil e proliferativo das células musculares lisas vasculares, levando à vasodilatação endotélio-dependente. Estes fatores incluem o NO, a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), vasodilatadores e potentes inibidores da função plaquetária e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Por outro lado, as células endoteliais podem também produzir vasoconstritores e promotores de crescimento (por estimular a proliferação das células da musculatura lisa) tais como, a angiotensina II, endotelina-1 (ET-1), tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>).

Segundo Norata e Catapano (68), a  $\text{PGI}_2$  é um potente vasodilatador derivado do endotélio, que atua significativamente com o óxido nítrico, induzindo a vasodilatação. É uma substância sintetizada a partir do ácido araquidônico derivado dos fosfolípidos das membranas celulares ou de fontes exógenas, como fosfolípidos e colesterol éster presente em lipoproteínas circulantes. A enzima responsável pela sua produção é a ciclooxigenase (COX), que possui duas isoformas: a isoforma constitutiva (COX1) e a induzida (COX2). A COX2 está envolvida em vários processos inflamatórios, incluindo a  $\text{PGE}_2$ , uma prostaglandina próinflamatória que modula a produção de metaloproteinase (MMP) na placa aterosclerótica.

As células endoteliais, também estão envolvidas na produção de moléculas específicas que tem uma importante função reguladora na resposta inflamatória, como as moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, cuja função principal é atrair e ancorar linfócitos e monócitos à superfície endotelial (62).

Em condições patológicas e provocadas por estresse bioquímico ou físico, incluindo a presença de fatores de risco para doenças cardiovasculares, o endotélio vascular passa por alterações funcionais e estruturais. Nos estágios iniciais, a principal alteração é meramente funcional e é chamada de disfunção endotelial com desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores. A principal característica dessa condição é a redução da biodisponibilidade de NO, com consequente alteração da vasodilatação dependente do endotélio, trombose e proliferação de células (67, 69).

O estresse oxidativo representa um dos principais aspectos envolvidos no desenvolvimento da disfunção endotelial e na patogênese das doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, dislipidemia, diabetes mellitus, aterosclerose, infarto do miocárdio e angina (70). As EROS são geradas a partir de várias enzimas oxidase, incluindo a nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), xantina oxidase, eNOS desacopladas, ciclooxigenase (COX), glicose oxidase e lipoxigenase, além do transporte de elétrons mitocondrial. As espécies reativas de oxigênio, incluem o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), ácido hipoclorídrico (HOCl), são produzidos por uma variedade de tipos celulares, incluindo as células da musculatura lisa vascular, as células endoteliais e mononucleares (64).

Além do estresse oxidativo, outros mecanismos podem atuar no comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio. Entretanto, as causas mais importantes da disfunção, envolvem a perda de equilíbrio nas vias de produção e liberação de NO, o que inclui a redução



da atividade e expressão da eNOS e o aumento de degradação do óxido nítrico através da reação com o superóxido (69, 71).

Na presença de diminuição na biodisponibilidade do NO, o endotélio programa várias vias fisiológicas na tentativa de compensar esta redução, para exemplificar, as vasodilatações dependentes do endotélio são garantidas, embora prejudicadas, também na presença de fatores de risco cardiovasculares, através da produção e liberação de vasodilatadores derivados do endotélio que não o NO, como prostanóides e outros fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (67, 71).

### **1.3 MÉTODOS *IN VIVO* DE MEDIDA DA FUNÇÃO ENDOTELIAL**

A avaliação da resposta vascular endotélio dependente tem sido ampla e clinicamente usada para os estudos da função endotelial. Os testes utilizam estímulos farmacológicos e/ou fisiológicos, que promovem a liberação endotelial de NO e outros compostos vasoativos e frequentemente envolvem uma comparação com as respostas vasculares a dilatadores endotélio independentes como a nitroglicerina (72).

Até o início da década de 90, a função endotelial era avaliada de modo invasivo, inicialmente através da injeção intra coronariana de acetilcolina (73). Em 1992, Celermajer e colaboradores (74) padronizaram o teste de reatividade da artéria braquial (BART), quando a função endotelial foi avaliada de modo simples por meio de ultrassonografia vascular.

A *flow-mediated dilation* (FMD) ou dilatação fluxo-mediada (DILA) é um teste padrão e não invasivo, utilizado para avaliar a função endotelial (74). O princípio do teste FMD é o de avaliar os efeitos arteriais após a liberação endotelial do NO (75-78).

A oclusão do fluxo sanguíneo arterial e sua subsequente liberação resultam no estresse de cisalhamento (*shear stress*) induzido por hiperemia reativa. Mede-se o diâmetro da artéria braquial, no estado de repouso e após a dilatação fluxo-mediada (Figura 2) (79).

O equipamento para realizar a análise de FMD deve conter *software* de imagiologia vascular bidimensional (2D), um eletrocardiograma e um monitor interno transdutor de alta frequência vascular. Um transdutor linear com frequência mínima de 7 MHz, ligado a um sistema de ultrassom de alta qualidade, é usado para obter imagens com resolução suficiente para a análise subsequente. A imagem é obtida com o indivíduo posicionado em decúbito dorsal, com o braço estendido em uma posição confortável para obter a imagem da artéria braquial. A observação da artéria braquial é feita por cima da antecubital, no plano longitudinal (80).

A dilatação endotélio dependente gera estímulo na artéria braquial através da utilização de um esfigmomanômetro (pressão arterial) colocado por cima da fossa anticubital ou no antebraço. A imagem é adquirida na linha da base, o fluxo sanguíneo é estimado pelo tempo médio da velocidade pulsante a partir de um volume de amostra. Depois disso, a oclusão arterial é criada pela insuflação da pressão sistólica. Normalmente a braçadeira é insuflada até pelo menos 50mm/Hg acima da pressão sistólica, com o fim de ocluir o influxo arterial durante um período de tempo normalizado e isto provoca isquemia e consequente dilatação dos vasos (79).

Segundo Corretti e colaboradores (80), a deflação do manguito induz um breve estado de alto fluxo através da artéria braquial (hiperemia reativa), e o aumento na tensão provoca a dilatação da artéria braquial. A imagem longitudinal da artéria, registra-se continuamente partindo de 30 segundos antes a 2 minutos após a deflação, e o sinal pulsativo por Doppler é obtido imediatamente após a liberação do manguito e no máximo 15 segundos após a deflação do manguito para avaliar a velocidade da hiperemia.

O diâmetro do vaso interfere nas respostas (maior diâmetro basal, menor dilatação) e as medidas são extremamente dependentes do examinador e do aparelho utilizado (79).

Vários outros fatores podem alterar os resultados do FMD: a temperatura deve ser controlada, alimentos como a cafeína, alimentos ricos em gordura, medicamentos e estímulos simpáticos, portanto os indivíduos devem jejuar por pelo menos 8-12 horas antes de realizar o ultrassom, que deve ser realizado em um local calmo e com temperatura por volta de 22°C, e se possível todos os medicamentos vasoativos devem ser suspensos por pelo menos 4 meias-vidas (80).

A redução do FMD é um marcador precoce da aterosclerose e se destaca por sua capacidade de prever futuros eventos de doenças cardiovasculares (74, 81-83) e a progressão da placa (84). A disfunção endotelial foi detectada em indivíduos com fatores de risco para doença coronária (hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo, diabetes), porém, sem evidências de DAC (85).

Há uma grande variabilidade nos estudos quando buscamos os valores de referência para o FMD, devido à grande sobreposição de populações (saudáveis, portadores de doença arterial coronariana, diabéticos), aos aspectos técnicos das medições do valor do FMD, como localização do manguito, duração da oclusão e tipo de equipamento utilizado. Observa-se ampla variabilidade dos valores de referência da FMD em indivíduos saudáveis, e admite-se o valor de referência entre de 7 a 10% do diâmetro basal (86). Entretanto, em pacientes com doença cardiovascular o valor do FMD é menor, com valores de 0 a 5% do diâmetro basal (87).

A FMD da artéria braquial tem sido estudada amplamente em pesquisa clínica, por permitir a avaliação seriada de indivíduos jovens, incluindo crianças. Também permite testar intervenções farmacológicas ou de estilo de vida na biologia endotelial em um estágio precoce pré-clínico, quando o processo de doença tem mais probabilidade de ser reversível. Esse teste é o padrão ouro para pesquisa clínica da biologia endotelial em vasos arteriais de condutância e sua introdução foi responsável por abrir um novo campo na área de epidemiologia vascular (72).

Em nosso trabalho, avaliamos a vasodilatação endotélio dependente da seguinte forma: após 12 horas de jejum durante a noite, os indivíduos foram examinados às 8 horas em uma sala silenciosa, a 22°C, por meio de um equipamento de ultrassom Vivid i (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA), com alta resolução (até 13 MHz) sonda vascular (12L-RS, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA), em modo-β. Os ciclos cardíacos foram monitorados simultaneamente por sistema de eletrocardiografia acoplada ao equipamento. O FMD foi verificado após 5 minutos da inflação de um manguito colocado abaixo do transdutor, 50 mm/Hg acima da pressão arterial sistólica. Imagens bidimensionais da artéria braquial foram obtidas durante 5 minutos a partir do eixo longitudinal e cerca de 5 a 10 cm acima da fossa antecubital. A expansão máxima do diâmetro da artéria braquial foi medida em triplicata no pico da onda T do ciclo cardíaco, antes da interrupção do fluxo e após a deflação do manguito.

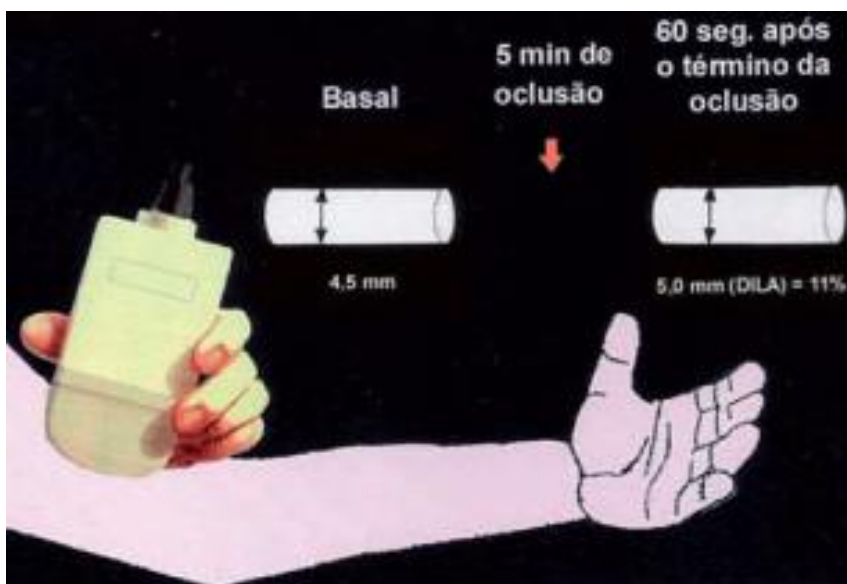


Figura 2- Avaliação da dilatação fluxo mediada da artéria braquial (79).

Evidências recentes sugerem que a função endotelial é um marcador que integra os efeitos resultantes da presença de fatores de riscos tradicionais sobre a parede arterial. A biologia do endotélio vascular é crítica não apenas na iniciação e na progressão da aterosclerose, mas também na transição da doença estável para o estado instável. Os estudos

da função endotelial em pesquisa clínica têm emergido como um “*end point*”, que complementa a dosagem de fatores de risco circulantes, técnicas de imagem como o espessamento da camada média-íntima da carótida, ultrassom intravascular e tomografia computadorizada, além de resultados clínicos cardiovasculares tradicionais, são cada vez mais utilizados para fechar um diagnóstico (72).

#### 1.4 NIACINA E LAROPIPRANTO

A niacina ou ácido nicotínico também é a vitamina B3 (88), cuja estrutura está ilustrada pela figura 3.

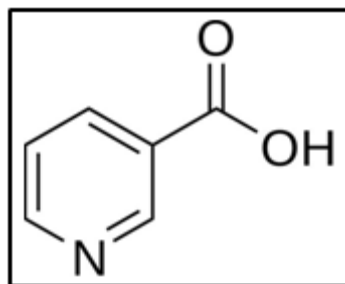


Figura 3- Estrutura química da niacina

Dois de seus derivados metabólicos, a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) e a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADP), são essenciais para todas as células do organismo e estão envolvidas em várias reações bioquímicas, incluindo glicólise, metabolismo do piruvato, biossíntese de pentose, ácidos graxos e esteróis (89).

Em 1955 Altschul e colaboradores (90), observaram que a niacina poderia ser utilizada como fármaco, para modificar o perfil lipídico de forma antidislipidêmica. Há mais de cinco décadas a niacina vem sendo estudada para o tratamento de dislipidemias e prevenção da aterosclerose (91). Na tabela 3 estão descritas as principais relevâncias históricas da niacina.

Tabela 3- Dados Históricos da Niacina

Pesquisador	Ano	Relevâncias	Referências
Elvehjem e col	1937	Isolamento da niacina no fígado	(92)

Altschul e col	1955	Descoberta das modificações dos lípides	(90)
Drug Project	1975	Associação da niacina com fibrato	(93)
Tunaru e col	2003	Descoberta do receptor GPR109A	(94)

A descoberta do receptor específico com alta afinidade pela niacina e acoplado à proteína transmembrana G (GPR109A), também chamado de ácido hidroxicarboxílico receptor 2 (HCA2), conduziu a novas pesquisas sobre os mecanismos que a niacina exerce por meio de seus efeitos farmacológicos (94-97).

Várias células expressam GPR109A e seus efeitos estão descritos na tabela 4.

Tabela 4- Expressão do receptor da niacina GPR109A (Lukasova e colaboradores (98))

Tipo celular	Efeito da ativação do receptor	Referências
Adipócito	Inibição da lipólise, aumento da liberação de adiponectina	(94, 99)
Neutrófilo	Apoptose	(100, 101)
Monócito/Macrófago	Efeito antiinflamatório, aumento da expressão do transporte de colesterol, aumento da transcrição e ativação de PPAR $\gamma$	(102, 103)
Células de Langherans	Aumento da formação de prostanóides (PGD2)	(100, 104)
Queratinócito	Aumento da formação de prostanóides (PGE2)	(100, 104)
Célula epitelial do intestino	--	(105)
Célula epitelial da retina	--	(106)

De maneira geral, a niacina atua por meio do receptor GPR109A, além de agir em adipócitos também tem influência em células imunológicas como monócitos/macrófagos e neutrófilos obtendo efeitos anti-inflamatórios, e aumentando a expressão de proteínas envolvidas no transporte de colesterol (99). O GPR109A ainda é encontrado em células de Langherans e queratinócitos da pele que são responsáveis pelo aumento da formação de prostanóides que induz o *flushing* (100, 104). Células epiteliais do intestino e da retina também

apresentam o receptor GPR109A, porém, o efeito da ativação nestes tecidos não está claro (105, 106).

#### **1.4.1 Ação da niacina em lípidos**

Em doses farmacológicas que variam de 250 a 2000 mg, a niacina reduz níveis plasmáticos de TG, LDL-C, VLDL-C e além disso é um fármaco eficaz no aumento das concentrações de HDL-C (20 a 30%) (107, 108). A niacina também diminui as concentrações de Apo B e Lp(a) e aumenta as concentrações de Apo AI em indivíduos tratados com estatina/niacina comparados a um grupo placebo/estatina durante um ano de tratamento, em concentrações de 1 a 2 g/dia de niacina (109).

O receptor GPR109A presente em adipócitos inibe a lipase hormônio-sensível em adipócitos resultando na redução de TG, ácidos graxos e VLDL (94-96). Esta via está bem descrita e envolve a redução na produção de AMP cíclico (98).

Porém em um estudo utilizando abordagens genéticas e farmacológicas em camundongos sem GPR109A e em ensaios clínicos em seres humanos com agonistas parciais e completos para GPR109A, demonstrou-se que o efeito da mobilização de ácidos graxos de adipócitos não é mediado pela ação da niacina sobre o receptor GPR109A no adipócito e sugere-se como hipótese alternativa que a diminuição do fluxo de AG para o fígado causado pela niacina seja devido à diminuição da expressão do coativador de transcrição PGC1 $\beta$  e reduzindo o inibidor da lipoproteína lipase Apo CIII que levaria a aumento do clearance de VLDL no plasma (110).

A figura 4 apresenta outros mecanismos pelos quais a niacina pode agir diretamente no fígado:

- 1- Diminuição de TG, VLDL, LDL e o aumento da HDL é resultado de uma ação da niacina no hepatócito que gera a inibição da atividade de Diacilglicerol Aciltransferase (DGAT2) nos

microsossomos hepáticos, resultando na diminuição da síntese de TG levando a um aumento da degradação intracelular de Apo B e a uma diminuição na secreção de partículas de VLDL e LDL (111).

2- O aumento das concentrações de HDL-C causado pela niacina pode ocorrer devido à inibição da expressão na superfície de hepatócitos da  $\beta$ -ATP sintase, diminuindo a absorção da HDL/Apo A1 por endocitose nos hepatócitos e assim mantendo o aumento de partículas de HDL/Apo A1 na circulação, sustentando este efeito leva a um aumento de transporte reverso de colesterol (111).

3- Outro mecanismo relacionado com o aumento da HDL plasmática pode ser observado via biogênese da HDL, o aumento da lipidação de Apo A1, por fosfolípides e colesterol via ABCA1, gera a pré- $\beta$  HDL em maior número, consequentemente observasse aumento de HDL no plasma (111).

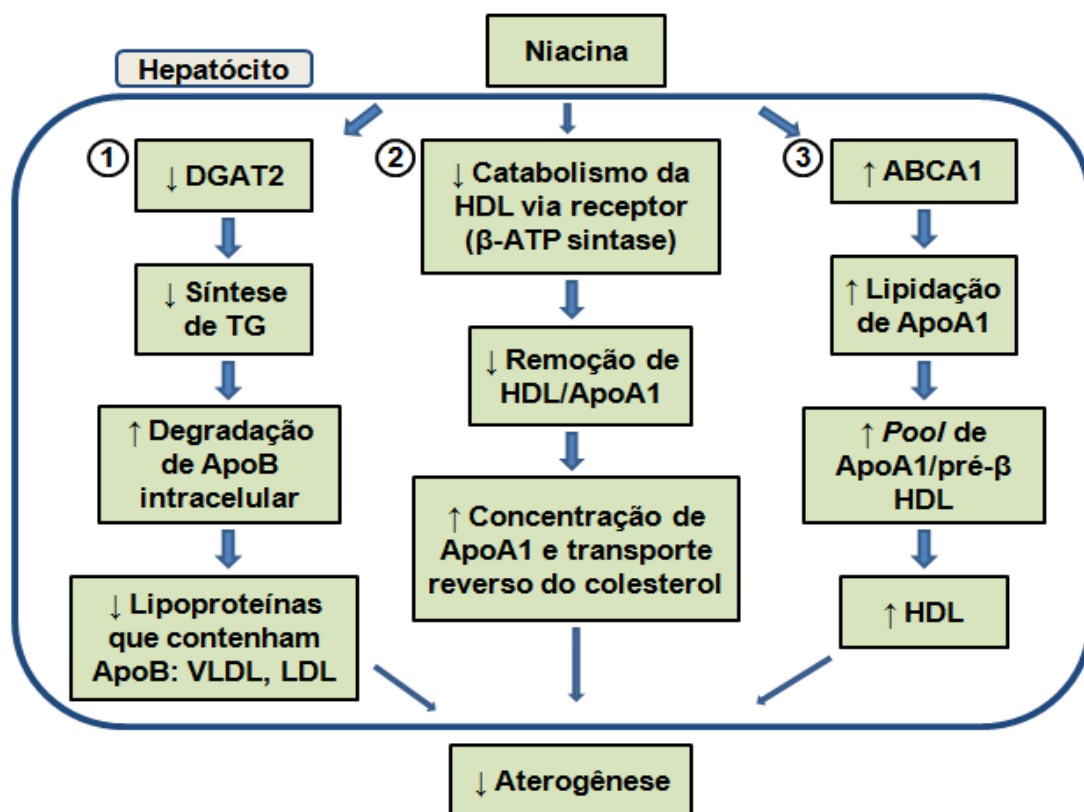




Figura 4- Kamanna e colaboradores (111). Mecanismos de ação lípides dependentes da niacina no fígado.

#### **1.4.2 Ação da niacina independente de lípides**

Há evidências que a niacina possui efeito sobre o estresse oxidativo e o processo inflamatório e, por consequência, sobre a função endotelial de forma independente da sua ação hipolipemiante (112).

Na figura 5 são observados os mecanismos de ação da niacina independentes de lípides.

1- A niacina tem ação sobre as células endoteliais, inibe a inflamação vascular, diminuindo a produção de EROS e posteriormente a expressão de VAM-1 e da proteína quimiotática de monócito MCP-1 resultando na diminuição da adesão de monócitos sobre a parede arterial (111).

Além das ações endoteliais vasculares da niacina, estudos também mostram que a niacina inibe a aterosclerose através da expressão de GPR109A em macrófagos e outras células imunológicas (102, 113).

2- Existem evidências de que a mieloperoxidase (MPO), derivado de neutrófilos, modifica a HDL transformando-a em disfuncional, a niacina inibe a atividade de MPO resultando na diminuição da concentração da HDL disfuncional, como consequência a HDL desempenha seu papel normalmente, como por exemplo: efluxo do colesterol e atividade anti-inflamatória (111).

3- Através do receptor GPR109A presente em macrófagos a niacina atua, aumentando a expressão de ABCA1 e como consequência elevando o efluxo do colesterol e a diminuição de células espumosas (111).

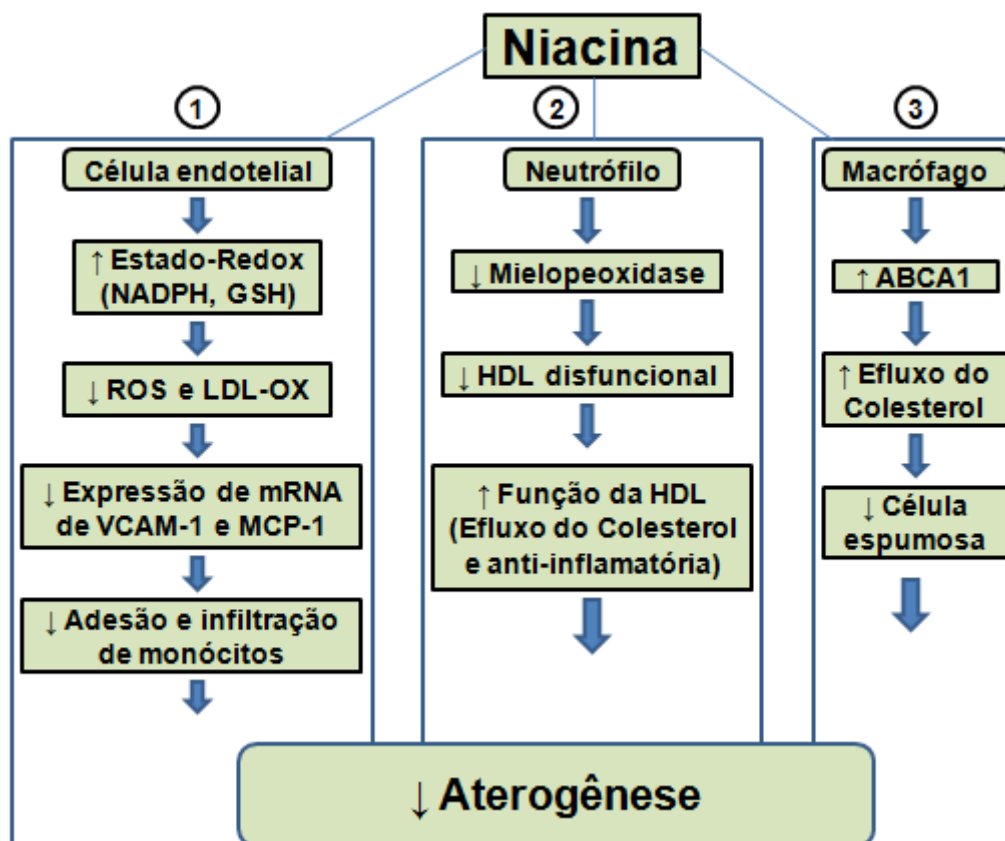


Figura 5- Kamanna e colaboradores (111). Efeitos da niacina sobre a aterosclerose independente das modificações em lípides no plasma.

Em um estudo em coelhos normolipidêmicos, foi observado nas artérias carótidas, redução da expressão de mediadores inflamatórios, como as moléculas de adesão VCAM e ICAM, e melhora na capacidade de vasodilatação após tratamento com niacina. Esse efeito foi consistentemente observado com a incubação de células endoteliais com a niacina sugerindo a existência de uma ação direta (114). Também há diminuição do estresse oxidativo nas artérias e diminuição da liberação de  $\text{TNF-}\alpha$ , com relação dose-resposta bem estabelecida (112).

Tavintharan em 2009 observou em células de cultura exposta à niacina que o fármaco inibiu a síntese de RNA para a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e PCAM-1) assim como ausência de elevação de  $\text{TNF-}\alpha$  mediada pela elevação da PCAM-1 (115).

O tamanho e a composição da partícula da HDL influenciam suas funções (116). Em tratamentos longos a niacina aumenta as concentrações plasmáticas de HDL-C e diminui o tamanho das partículas de HDL, intermediando a redução da inflamação sistêmica e disfunção endotelial (117). Estes resultados podem ser explicados por resultados prévios que indicam que a HDL com tamanho pequeno e rica em fosfolípidos está associada a funções antioxidante, anti-inflamatória, antiapoptótica e de efluxo de colesterol celular (118).

Por outro lado, HDLs maiores estão associadas positivamente com a função de vaso dilatação endotelial possivelmente pelo efluxo de colesterol via ABCG1 (40). Os dados escassos e divergentes implicam na necessidade de mais estudos sobre estes efeitos.

A niacina pode induzir respostas inflamatórias e antioxidantes ativando a heme oxigenase 1 (HO-1), assim aumentando a geração de metabólitos de heme particularmente a bilirrubina (119). Estudos em modelos animais e cultura celular demonstraram que a niacina ativa GPR109A em leucócitos e HO-1 que promovem a via de efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (107, 120). Curiosamente, o marcador inflamatório us-PCR não apresentou alteração plasmática em um estudo randomizado durante três meses utilizando doses crescentes de até 1,5g/dia (121).

Bregar e colaboradores em 2013 avaliaram a função endotelial pelo FMD (endotélio – dependente) e induzida pela nitroglicerina (endotélio – independente), foram avaliados indivíduos após infarto do miocárdio, onde um primeiro grupo fez o uso de niacina/laropiranto por 12 semanas e um segundo grupo foi placebo, foi observado que tanto nas avaliações pelo FMD quanto pela ação da nitroglicerina o grupo de indivíduos que fez o uso da niacina/laropiranto comparado ao placebo, demonstrou um aumento significativo da vasodilatação. Este estudo demonstrou que a associação niacina/laropiranto melhora a dilatação endotélio dependente e independente na artéria braquial e esta melhora não se correlaciona a mudanças em parâmetros lipídicos (122).

Outras ações benéficas da niacina e de alguns agonistas do receptor GPR109A tem sido estudadas como benéficos para o tratamento de outras doenças inflamatórias além da aterosclerose como esclerose múltipla, psoríase, doenças neurológicas como mostrado em Lukasova e colaboradores (98).

### 1.4.3 Efeitos colaterais da niacina

Existem três formas de apresentação da niacina como fármaco, e elas estão relacionadas às vias catabólicas deste fármaco: a de liberação rápida que é absorvida e excretada com um pico de ação entre 30 e 60 minutos, outra forma é a de liberação intermediária ou estendida, cujo pico de ação é entre 8 e 12 horas sendo a forma mais usada atualmente, e por fim a forma de liberação lenta que possui pico de ação em mais de 12 horas (108).

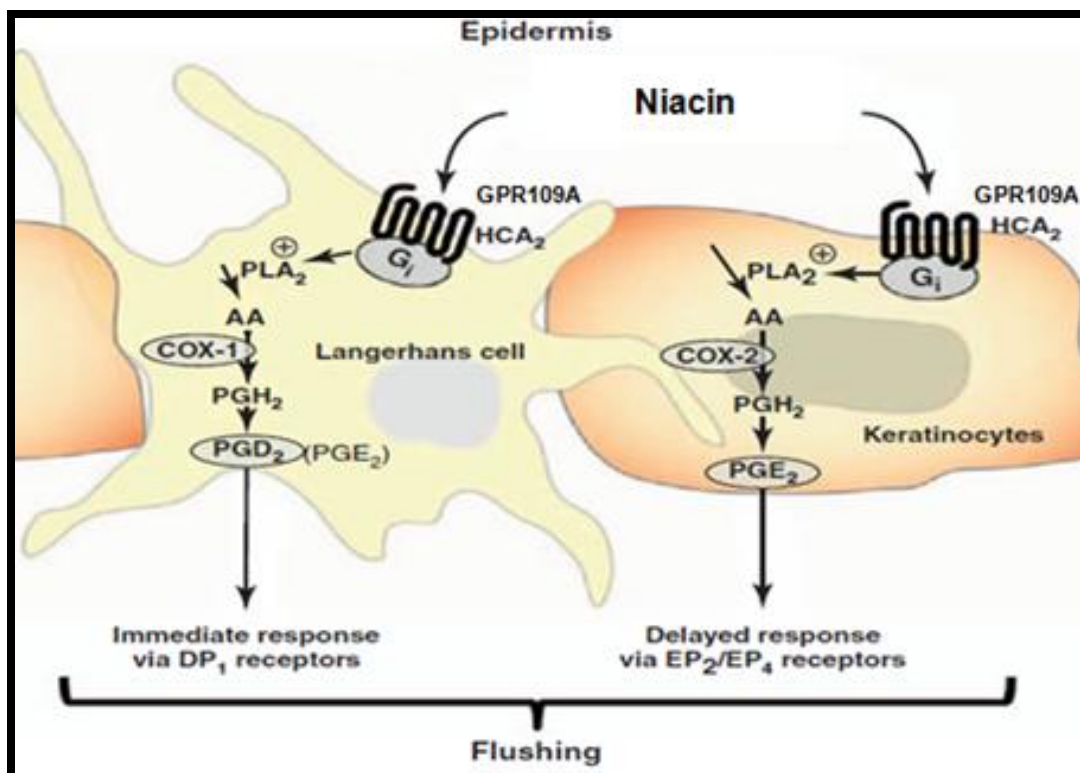
O catabolismo da niacina é realizado por duas vias: (1) a via na qual a niacina é conjugada com a glicina para formação do ácido nicotinúrico e (2) a via que abrange uma série de reações de óxido-redução formando a nicotinamida e derivados pirimidínicos (108).

O uso da niacina é limitado pela alta taxa de efeitos colaterais, dentre os quais o principal é a ruborização (*flushing*) e calor, que levam aproximadamente a 50% dos casos de interrupção do tratamento (108).

O *flushing* ocorre principalmente alguns minutos após o uso da fórmula de ação imediata, e a niacina em grande quantidade satura a via da niacinamida e passa, então, a ser convertida a ácido niacinúrico, que dispara a produção de prostaglandinas levando ao *flushing* (123).

A figura 6 descreve a ação da niacina induzindo o *flushing* pela ativação do receptor GPR109A. A formação de prostanóides PGD2 e PGE2 ocorre através da ativação da ciclooxigenase-1 (COX-1) a qual é responsável pelo processo agudo do *flushing* nas células de

Langherans; já a ativação de ciclooxigenase-2 (COX-2) dependente de PGE2 nos queratinócitos é responsável pelas fases finais do *flushing*. Os prostanóides PDG2 gerados atuam através do receptor DP1 e os prostanóides gerados nos queratinócitos PGE2 operam via receptores EP2 e EP4 (98).



**Figura 6-** Lukasova e colaboradores (98). Mecanismos pelos quais a niacina induz o *flushing*. Ácido araquidônico (AA), fosfolipase A2 (PLA2), prostaglandina H2 (PGH2), receptor específico da niacina (GPR109A ou HCA2).

O uso agudo deste fármaco promove produção imediata das PGE2 e PGD2 em grandes quantidades levando a vasodilatação intensa generalizada, com hipotensão arterial, taquicardia reflexa e mal-estar (124).

Algumas estratégias já foram testadas para amenizar o *flushing*, a primeira é a administração do fármaco à noite, antes de o paciente dormir para que a vasodilatação ocorra durante o sono do paciente; outra opção é administrar a niacina associada a anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) como a indometacina ou o ácido acetilsalicílico, e a mais recente e

aparentemente mais eficaz é a associação de um antagonista específico dos receptores de PGD2, o laropiranto (123). Este antagonista competitivo da PGD2 foi desenvolvido para evitar esse efeito colateral indesejável. O laropiranto, não tem nenhuma propriedade sobre o metabolismo lipídico, porém, reduz a ocorrência e intensidade do *flushing* em 47% (125). A associação da niacina ao laropiranto diminuiu de maneira bastante significativa o abandono ao tratamento e diminuiu também a necessidade de associar AINES (anti-inflamatórios não esteroideogênicos) para melhorar a tolerância ao tratamento (126).

O tratamento com niacina é conhecido por aumentar discretamente os níveis de glicose e ácido úrico no plasma, efeitos leves, mas pode ser necessário interromper a terapia (127, 128). De qualquer forma, apesar deste efeito levar a uma maior atenção no uso da niacina para pacientes diabéticos, alguns trabalhos demonstraram que o uso do fármaco nestes indivíduos é seguro, com alterações sobre o metabolismo glicêmico pouco significativo e sem interação com o benefício da medicação na atenuação da incidência de eventos cardiovasculares (127, 129).

Outros efeitos colaterais com menor frequência observados são pele seca, *acantose nigricans*, poucos casos de edema de retina, hiperuricemia, gota, arritmias cardíacas, tontura, calafrios, edema, cefaléia, e ativação de úlcera péptica que desaparecem com a interrupção do uso do fármaco (130).

#### **1.4.4 Niacina em estudos de longo e curto prazo**

Estudos sobre os efeitos da niacina em curto prazo são escassos.

De acordo com Usman e colaboradores (131) que avaliaram a ação aguda da niacina de liberação estendida (2g/dia), sobre a hipertrigliceridemia pós-prandial, observou-se uma diminuição de TG pós-prandial em indivíduos que fizeram o uso de niacina de liberação estendida antes de uma refeição rica em gordura, indicando que o medicamento teve efeito agudo, provavelmente

pela diminuição de ácidos graxos livres limitando assim as lipoproteínas de muito baixa densidade e acelerando o catabolismo dos QM.

Por outro lado Plaisance e colaboradores (132) observaram que indivíduos que fizeram o uso de niacina de liberação estendida durante seis semanas (primeira semana 1,5 g/dia, segunda semana 1 g/dia e terceira a sexta semana 1,5 g/dia) tiveram uma redução de TG em jejum, mas a niacina não teve influência sobre níveis de TG pós-prandiais após uma refeição rica em gordura.

O estudo *Coronary Drug Project* realizado na década de 1970 (93, 133) demonstrou que a niacina administrada isoladamente pode reduzir a incidência de eventos coronarianos e na mortalidade total. Mais recentemente outros estudos mostraram reduções de lesões angiográficas (134) e espessura íntimo-medial de carótidas em pacientes com DCV (135).

Com a maior utilização de estatinas como tratamento padrão dois grandes ensaios clínicos recentes o *Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcomes (AIM-HIGH)* (136) e o *The Heart protection Study 2 - Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events (HPS2-THRIVE)* (137) foram desenvolvidos para investigar a adição de niacina como um benefício incremental sobre a monoterapia com estatina em eventos cardiovasculares primários e em indivíduos com doença cardiovascular estabelecida.

O *AIM-HIGH* foi realizado em 3.414 indivíduos com DAC e os resultados mostraram falha no incremento de ateroproteção pela niacina em indivíduos em uso de sinvastatina (138).

Após três anos de acompanhamento o trabalho foi interrompido pelo *Data Safety Monitoring Board*, devido a falta de eficácia da niacina de liberação estendida sobre os desfechos primários (tempo para o primeiro efeito não fatal: acidente vascular cerebral isquêmico, sintomas de revascularização cerebral e coronário e síndrome coronária aguda), este desfecho ocorreu em

282 (16,4%) indivíduos tratados com niacina em comparação com 274 (16,2%) tratados como placebo (138, 139).

Vários pontos deste estudo foram contestados e reconhecidos como falhos pelos pesquisadores (140). Os indivíduos tratados com estatina e com LDL-C  $\leq 70$  mg/dL utilizados já podem ter causado uma depleção de lípidos na placa coronária (140).

Assim os resultados do *AIM-HIGH* não podem ser explorados em outras populações. Um sub-estudo do *AIM-HIGH* recente com 524 indivíduos com TG superior a 198 mg/dL e HDL-C inferior a 33 mg/dL, tratados com niacina mostrou uma tendência a efeitos benéficos de risco cardiovascular (141).

Em um ensaio clínico maior com 25.000 participantes, o *HPS2-THRIVE* examinou se a adição da niacina de liberação prolongada associada ao laropiranto em terapia com sinvastatina associada ou não à ezetimiba aumentaria os benefícios relativos a eventos cardiovasculares primários e em doença cardiovascular estabelecida (137). O trabalho foi interrompido após 3,9 anos do início por causa de eventos adversos, como hemorragia estomacal, aumento de infecções e miopatia no grupo niacina/laropiranto.

Uma questão crítica do *HPS-2THRIVE* foi o uso do laropiranto antagonista da PGD<sub>2</sub>, proposto para reduzir o rubor induzido pela niacina, pois há uma escassez de informações científicas quanto ao efeito patológico, como aumento de infecções (142) e ações plaquetárias (139).

O ponto final primário do estudo também não foi satisfatório e estes resultados foram divulgados na *Home Page* do (*HPS2-THRIVE*) (143). Quando adicionada niacina de liberação prolongada com laropiranto a um tratamento com estatina, não há redução clinicamente significativa na taxa de eventos cardiovasculares (143).



Portanto até o momento a adição da niacina ao tratamento com estatinas, testado em *AIM-HIGH* e *HPS2-THRIVE*, não demonstrou redução de eventos cardiovasculares e aumentou vários efeitos adversos (144).

Sub análises detalhadas dos ensaios do *AIM-HIGH* e do *HPS2-THRIVE* devem ser realizadas, e espera-se que elucidem o papel da niacina na redução de eventos cardiovasculares (111).

Frente à escassez de estudos publicados sobre efeitos agudos da niacina, em nosso trabalho avaliamos em indivíduos hipoalfalipoproteinêmicos o efeito da niacina em curto prazo (sete dias), de (1g/dia) de niacina de liberação estendida ou associada ao laropiranto – (1g/20mg/dia) - sobre a função endotelial, parâmetros bioquímicos séricos e físico-químicos.

## **1.5 QUESTÕES QUE MOTIVARAM O ESTUDO**

O tratamento em curto prazo com niacina pode:

- Elevar a concentração de HDL?
- Atenuar o estresse oxidativo e atividade inflamatória?
- Melhorar a função endotelial?
- A adição de laropiranto interfere com o efeito da niacina sobre a vasodilatação endotélio dependente?
- A niacina pode ser considerada um fármaco candidato para estudos clínicos relacionados a aumento agudo da resposta oxidativa/inflamatória e declínio da função endotelial, como por exemplo, o infarto do miocárdio?

## **OBJETIVOS**

---

- Avaliar em indivíduos hipoalfalipoproteinêmicos os efeitos do uso em curto prazo (sete dias) de 1 g/dia de niacina de liberação estendida (NLE) ou associada ao laropiranto 1g/20mg/dia (NLE/LRPT), sobre a função endotelial determinada *in vivo* por dilatação fluxo mediada da artéria braquial.
- Avaliar em indivíduos hipoalfalipoproteinêmicos os efeitos do uso de 1 g/dia de niacina de liberação estendida (NLE) ou associada ao laropiranto 1g/20mg/dia (NLE/LRPT), sobre parâmetros séricos bioquímicos e físico-químicos tais como glicose, bilirrubinas, perfis lipídico, lipo e apoprotéico, proteína de transferência de colesterol éster, proteína C reativa e tamanho da HDL.

## **CAPÍTULO**

## **Short-term effect of extended-release niacin with and without the addition of laropiprant on endothelial function in individuals with low HDL-C**

Valeria Nasser Figueiredo<sup>1</sup> PhD, **Felipe Vendrame**<sup>2</sup>, Bruno A. Colontoni<sup>1</sup> MD, Thiago Quinaglia<sup>1</sup> MD PhD, Jose Roberto Matos-Souza<sup>3</sup> MD PhD, Filipe Azevedo Moura<sup>1</sup> MD, Otavio R. Coelho<sup>1</sup> MD PhD, Eliana C. de Faria<sup>2</sup> MD PhD, Andrei C Sposito<sup>1</sup> MD PhD

### **Affiliations:**

<sup>1</sup>Cardiology Division, State University of Campinas Medical School, Campinas, SP, Brazil

<sup>2</sup>Lipids Laboratory, State University of Campinas Medical School, Campinas, SP, Brazil

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, State University of Campinas Medical School, Campinas, SP, Brazil

**The first two authors contributed equally to this study.**

Abstract: 240 words

### **Address for correspondence**

Professor Andrei C Sposito

Cardiology Division,

State University of Campinas (Unicamp),

13084-971, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

Tel 55 191 3521 7098

Fax 55 19 3289 4107

Email: andreisposito@gmail.com

## **Abstract**

**PURPOSE:** Reduced plasma concentration of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol is associated with vulnerability to oxidative stress and propensity to endothelial dysfunction. Niacin directly activates both GPR-109A in leukocytes and heme oxygenase-1 (HO-1) pathway promoting strong anti-inflammatory and anti-oxidative effects. Hence, this study investigated the short-term effect of niacin on endothelial function in subjects with low HDL-cholesterol (HDL -C). **METHODS:** Subjects (n=18) were treated with extended-release niacin 1g/day alone (ERN, Metri, Libbs Farmaceutica, Sao Paulo, Brazil) and niacin associated with Laropiprant 1g/20mg (ERN/LRPT, Cordaptive, Merck, Sao Paulo, Brazil) in a crossover study design. The sequence of treatments was decided by simple randomization. Plasma samples and flow-mediated dilation of brachial artery (FMD) were obtained at baseline, 7<sup>th</sup> day of treatment 1, 7<sup>th</sup> day after washout and 7<sup>th</sup> day of treatment 2.

**FINDINGS:** Triglyceride levels decreased by 4% and 3% and HDL size decreased by 5.8% and 6.2% after ERN and ERN/LRPT therapies respectively (p<0.05). There was no change in HDL-C levels and cholesteryl esterase transfer protein activity after both treatments. The median increase of FMD was 4.5% and 4.1% in the ERN and ERN/LRPT groups, respectively, which receded after washout. At the intergroup analyses, there was no difference with respect to variation of plasma HDL-C, triglycerides, CRP, direct bilirubin and FMD.

**IMPLICATIONS:** Our findings reveal that short-term niacin therapy could improve endothelial function in subjects with low HDL-C levels. The addition of PGD2 antagonist did not influence niacin's effect on endothelial function.

**ClinicalTrials.gov Identifier:** NCT01942291

**Keywords:** Niacin; Endothelial function; Laropiprant; HDL

## Introduction

The endothelium is acutely sensitive to nitric oxide (NO) and its downstream autacoids such as reactive oxygen species (ROS) and inflammatory mediators, which can cause a rapid decline of its protective functions. In fact, such an abrupt and systemic endothelial dysfunction occurs and contributes to tissue damage in several clinical conditions such as ketosis <sup>(1)</sup>, arterial thrombosis <sup>(2)</sup>, acute renal failure <sup>(3)</sup> and post-coronary angioplasty <sup>(4)</sup>. Accordingly, therapies that can at short-term alleviate endothelial dysfunction have been sought.

Studies in animal and cell models have demonstrated that niacin activates both GPR-109A in leukocytes and heme oxygenase-1 (HO-1) pathway promoting strong anti-inflammatory and anti-oxidative effects <sup>(5-6)</sup>. In addition, activation of GPR109A induces immediate production of prostaglandin (PG) D2, which stimulates PGD2 receptor 1 leading to skin as well as systemic vasodilatation <sup>(7-8)</sup>. These vasodilating PGs are synthesized by the endothelium via cyclooxygenase pathway in order to mediate arterial dilation induced by intermittent hypoxia <sup>(9)</sup>. Altogether, the effects of niacin can hypothetically alleviate, at short-term, endothelial dysfunction. To this date, however, this evidence in human beings is lacking.

Individuals with reduced plasma concentration of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol are more susceptible to oxidative stress and often present reduced endothelial function <sup>(10)</sup>. This characteristic makes these individuals eligible candidates to safely test the acute effects of antioxidant/anti-inflammatory therapies on endothelial function. In this context, the aim of this study was to investigate the short-term effect of niacin on endothelial function and verify the existence of interaction of PGD2 receptor antagonist, i.e. laropiprant (LRPT), in subjects with low HDL-cholesterol (HDL -C).

## **Methods**

### **Participants**

The study was performed on 18 asymptomatic individuals that were eligible if they were men or women aged between 20 and 60 years and had plasma HDL -C levels below 40 mg/dL. The exclusion criteria were: (i) symptomatic atherosclerotic disease, (ii) diabetes (prior diagnosis, fasting glucose  $\geq 126$  mg/dL, or glycosylated hemoglobin  $\geq 6.5\%$ ), (iii) significant liver disease (alanine aminotransferase or aspartate aminotransferase level  $\geq 1.5$  x upper limit of normal), (iv) significant renal disease (creatinine  $\geq 1.2$  mg/dL), (v) thyroid dysfunction (thyroid stimulating hormone  $\geq 5$  mU/L), (vi) indication for or use of lipid-lowering treatment in the last six months, (vii) use of anti-inflammatory treatment in the last 30 days, (viii) current or previous diagnosis of cancer or immune inflammatory diseases, (ix) chronic obstructive pulmonary disease, (x) infectious disease manifested in the last 3 months and (xi) body mass index  $\geq 26$  kg/m<sup>2</sup>. The study was approved by the Ethics Committee of the institution and all participants signed an informed consent form before enrollment.

### ***Study design and treatments***

The study was randomized, double-blind, controlled, using a 2-way crossover design with both treatment periods and washout time lasting 7 days. Subjects were allocated by simple randomization to extended-release niacin 1g/day alone (ERN, Metri, Libbs Farmacêutica, São Paulo, Brazil) or niacin associated with LRPT 1g/20mg (ERN/LRPT, Cordaptive, Merck, São Paulo, Brazil). Medications were kindly supplied by Libbs and Merck. Plasma samples and brachial artery reactivity were obtained at baseline, 7<sup>th</sup> day of treatment 1, 7<sup>th</sup> day after washout and 7<sup>th</sup> day of treatment 2 (Figure 1).

### ***Study Measurements***

The following blood measurements were performed using the Modular Hitachi system and Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) reagents: glucose (GOD-PAP), triglycerides (TG)

(GPO-PAP), HDL-C (HDL-C plus 3rd generation) and C-reactive protein (CRP) (high-sensitivity CRP, Cardiophase, Dade Behring, Marburg, Germany). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated by the Friedewald formula. Apolipoprotein AI (Apo AI) and apolipoprotein B100 (apoB100) and Lipoprotein (a) were measured by nephelometric assays in the Array 360 system (Beckman Instruments, USA) and the Dade Boehringer system (Boehringer, Germany).

Subjects' plasma CETP activity were measured by an exogenous substrate assay that measures the transfer of radiolabelled cholesteryl ester from HDL of a healthy human plasma pool to an unlabelled acceptor mixture of very low-density lipoprotein and LDL. The results are expressed as a percentage of CE transferred from HDL to the apolipoprotein B (apoB)-containing lipoproteins over a 4h time length <sup>(11)</sup>. The inter-assay coefficient of variation was 12%.

The mean diameter of total HDL particles was determined by the Dynamic Laser Scattering technique, as earlier described <sup>(12)</sup>. A Nanotrak Particle Size Analyzer (Microtrac, North Largo, Florida, USA) was used to analyze each sample in triplicate with 30 seconds of running time. A 100 nm polymeric nanoparticle was used as standard, and the intra-assay coefficient of variation was 0.41 %.

Endothelial-dependent vasodilation was assessed by ischemia-induced reactive hyperemia. Briefly, after 12-hour overnight fasting, patients were examined at 8 a.m. in a quiet room at 22°C by using an ultrasound equipment Vivid i (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA) with a high-resolution (up to 13 MHz) vascular probe (12I-RS, GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA) in B-mode. The cardiac cycles were monitored simultaneously by electrocardiography coupled to the equipment. Flow-mediated dilation (FMD) was assessed after 5-minutes inflation of a cuff placed below the transducer, 50 mm Hg above the systolic blood pressure. Two-dimensional images of the brachial artery were obtained during 5 minutes from the longitudinal axis approximately 5-10 cm above the antecubital fossa. The maximum expansion of the



diameter of the brachial artery was measured in triplicate at the peak of the T wave of the cardiac cycle before the interruption of the flow and post deflation.

### ***Statistical analyses***

Normally distributed data are presented as mean  $\pm$  SD and skewed data as median and interquartile range (IQR). Nonparametric data (CRP and FMD) were normalized by log transformation. A doubly multivariate repeated measures design was used to assess the interindividual variation in FMD and CRP for each treatment arm, adjusting for age and gender. Tukey's HSD was used for post hoc comparisons. Assumptions of doubly multivariate repeated measures design (multivariate normal distribution and equal variance-covariance matrices across the cells) were checked using histograms, normal probability plots, residual scatterplots and Box's M test. The comparison of the delta FMD and CRP (post-treatment minus pretreatment) between the arms was performed by paired student T test. Statistical analyses were performed using IBM-SPSS version 20, and a probability value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

### **Results**

Participants were 61% (11) male, aged  $42 \pm 17$  years and completed the study without any period of treatment interruption. TG levels decreased by 4% ( $p=0.04$ ) from the baseline in the ERN group and by 3% ( $p=0.03$ ) from the baseline in the ERN/LRPT group. There was no difference in HDL-C levels or CETP activity between both groups for both treatments. The HDL particle size decreased by 5.8% in the ERN group ( $p=0.001$ ) and by 6.2% in ERN/LRPT group ( $p=0.003$ ).

Direct bilirubin levels were increased by 62% in the ERN group ( $p=0.04$ ) and by 50% in the ERN/LRPT group ( $p=0.02$ ). The median increase of FMD was 4.5% (4.3) ( $p=0.002$ ) and 4.1% (5.3) ( $p=0.004$ ) in the ERN and ERN/LRPT groups, respectively. Intergroup analyses

shows there was no difference with respect to variation of plasma HDL-C, TG, CRP, direct bilirubin and FMD.

After a 7-day period of washout, there was an increase of 15% in plasma TG ( $p=0.007$ ) and of 5% in HDL particle size ( $p=0.003$ ). The median decrease of FMD for both groups was 2.8% (3.7) ( $p=0.002$ ).

Mild to moderate flushing was experienced in 22% and 17% of the patients treated by ERN and ERN/LRPT, respectively ( $p=0.37$ ). Plasma glucose values significantly increased by 5% ( $p=0.01$ ) in ERN group and by 8% in ERN/LRP group ( $p=0.02$ ), and decreased by 6% after the washout period ( $p=0.002$ ).

## **Discussion**

The main findings of the present study are: (i) a 7-day period of treatment with niacin is sufficient to modify lipid profile and improve endothelium-dependent arterial dilation, (ii) the concomitant use with laropirant did not interfere with niacin's improvement of endothelial function, and (iii) after 7 days of niacin withdrawal the lipid and endothelial effects subside.

Although recent clinical trials <sup>(13-14)</sup> failed to demonstrate additional benefit of long-term niacin therapy on top of statin-based cardiovascular prevention, investigation of its short-term effects remains scarce. In subjects with coronary artery disease and low HDL-C, a 12-week niacin treatment period was followed by a significant improvement in endothelial function <sup>(15)</sup>. Our findings take a step forward showing that such an effect may be observed in a shorter period of treatment. In addition, we observed that LRPT did not interfere with niacin's effect on endothelial function, suggesting that this effect of niacin is at least partially independent of the PGD2-mediated vasodilation pathway. These findings strengthen the need for investigation of the potential benefit of niacin in clinical conditions associated with acute decline of endothelial function.

Niacin activates HO-1 and by this way increases the generation of heme metabolites, particularly bilirubin, which may mediate niacin's anti-inflammatory and anti-oxidative effects <sup>(16)</sup>. Indeed, we found that plasma bilirubin increases after 7 days of treatment with niacin and decreases after its withdrawal. Still, we found no change in systemic inflammatory activity as estimated by CRP, which may be due to the short treatment length or the selection of individuals with low baseline CRP levels.

After longer periods of treatment, niacin raises plasma HDL-C and decrease HDL particle size, which may mediate reduction of systemic inflammation and endothelial dysfunction <sup>(17)</sup>. In our study only HDL size reduction was observed, which may have collaborated towards the improvement of FMD. These findings may be explained by previous data that suggest that small HDL size is associated with greater antioxidative properties <sup>(18)</sup>. Conversely, a more recent finding has shown that large HDL size is positively associated with endothelial function <sup>(19)</sup>. The scarce and opposing data imply a need for further studies regarding this specific effect.

The incidence of moderate flushing was not attenuated in subjects in whom niacin was co-administered with LRPT, which must have been due to the play of chance. Also, niacin caused a small and reversible increase in blood glucose, which is consistent with prior studies <sup>(20)</sup>.

In conclusion, this study demonstrated that short-term niacin therapy could improve endothelial function in subjects with low HDL-C levels. This finding upholds the investigation of niacin treatment in other clinical conditions where acute decline of endothelial function may influence the outcome.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest

### **Acknowledgments**

During this study Valeria N. Figueiredo and Felipe Vendrame were supported by the State of São Paulo Research Foundation (Fapesp) research grants, SP, Brazil. Prof. Sposito and Eliana C de Faria are supported by a fellowship grant of productivity in research from the Brazilian National Research Council (CNPq). The authors had full access to the data and take responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written. This article is part of a master's degree thesis by Felipe Vendrame and post-doctoral fellowship duties of Valeria N. Figueiredo.

### **Authors' contributions**

VNF, FV, ECF and ACS contributed to the design, analysis, and interpretation of this study. FV, TQ and BAC contributed to the data collection and critical analysis of clinical and laboratory data. ORC, ECF and ACS contributed to the writing of this manuscript and critical review of the version for submission.

### **References**

- (1) Avogaro A, Calo L, Piarulli F, et al. Effect of acute ketosis on the endothelial function of type 1 diabetic patients: the role of nitric oxide. *Diabetes*. 1999; 48:391-7.
- (2) Kashyap VS, Reil TD, Moore WS, et al. Acute arterial thrombosis causes endothelial dysfunction: a new paradigm for thrombolytic therapy. *J Vasc Surg*. 2001; 34:323-9.
- (3) Ruschitzka F, Shaw S, Noll G, et al. Endothelial vasoconstrictor prostanoids, vascular reactivity, and acute renal failure. *Kidney Int Suppl*. 1998; 67:S199-201.
- (4) Han B, Ghanim D, Peleg A, et al. Loss of systemic endothelial function post-PCI. *Acute Card Care*. 2008; 10:79-87.
- (5) Wu BJ, Chen K, Barter PJ, et al. Niacin inhibits vascular inflammation via the induction of heme oxygenase-1. *Circulation*. 2012; 125:150-8.
- (6) Ruparelia N, Digby JE, and Choudhury RP. Effects of niacin on atherosclerosis and vascular function. *Curr Opin Cardiol*. 2011; 26:66-70.

- (7) Kamanna VS, Ganji SH, and Kashyap ML. The mechanism and mitigation of niacin-induced flushing. *Int J Clin Pract.* 2009; 63:1369-77.
- (8) Cheng K, Wu TJ, Wu KK, et al. Antagonism of the prostaglandin D2 receptor 1 suppresses nicotinic acid-induced vasodilation in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:6682-7.
- (9) Markwald RR, Kirby BS, Crecelius AR, et al. Combined inhibition of nitric oxide and vasodilating prostaglandins abolishes forearm vasodilatation to systemic hypoxia in healthy humans. *J Physiol.* 2011; 589:1979-90.
- (10) Mineo C and Shaul PW. PON-dering differences in HDL function in coronary artery disease. *J Clin Invest.* 2011; 121:2545-8.
- (11) Lagrost L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol.* 1998; 110:231-41.
- (12) Lima ES and Maranhao RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin Chem.* 2004; 50:1086-8.
- (13) HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. *Eur Heart J.* 2013; 34:1279-91.
- (14) The role of niacin in raising high-density lipoprotein cholesterol to reduce cardiovascular events in patients with atherosclerotic cardiovascular disease and optimally treated low-density lipoprotein cholesterol: baseline characteristics of study participants. The Atherothrombosis Intervention in Metabolic syndrome with low HDL/high triglycerides: impact on Global Health outcomes (AIM-HIGH) trial. *Am Heart J.* 2011; 161:538-43.
- (15) Warnholtz A, Wild P, Ostad MA, et al. Effects of oral niacin on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: results of the randomized, double-blind, placebo-controlled INEF study. *Atherosclerosis.* 2009; 204:216-21.
- (16) Stocker R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal.* 2004; 6:841-9.
- (17) Kashyap ML. Basic considerations in the reversal of atherosclerosis: significance of high-density lipoprotein in stimulating reverse cholesterol transport. *Am J Cardiol.* 1989; 63:56H-59H.
- (18) Kontush A, Chantepie S, and Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:1881-8.

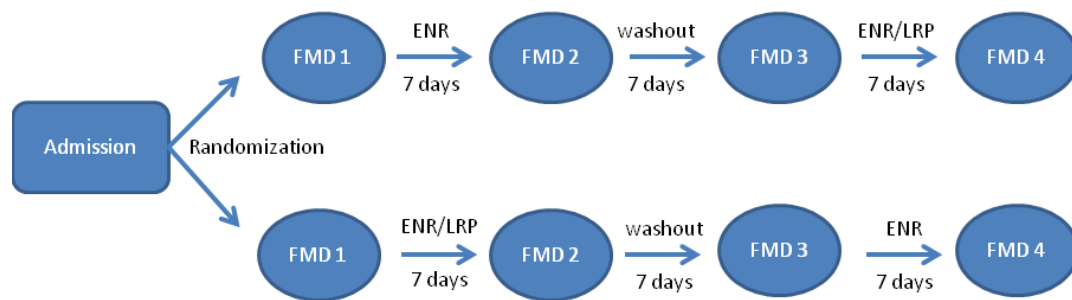
- (19) Ford MA, McConnell JP, Lavi S, et al. Coronary artery endothelial dysfunction is positively correlated with low density lipoprotein and inversely correlated with high density lipoprotein subclass particles measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Atherosclerosis*. 2009; 207:111-5.
- (20) Rajanna V, Campbell KB, Leimberger J, et al. Elevation of fasting morning glucose relative to hemoglobin A1c in normoglycemic patients treated with niacin and with statins. *J Clin Lipidol*. 2012; 6:168-73.

**Table 1:** Short-term effect of extended-release niacin with and without laropiprant

Parameters	Periods				P values			
	Baseline (B)	ERN/LRP	ERN	Washout (W)	B vs. W	B vs. ERN/LRP	B vs. ERN	ERN vs. ERN/LRP
Triglycerides, mg/dL	194 ± 36	190 ± 107	188 ± 109	221 ± 129	0.95	0.03	0.04	0.84
LDL-C, mg/dL	114 ± 24	103 ± 23	110 ± 30	116 ± 24	0.36	0.08	0.1	0.16
HDL-C, mg/dL	32 ± 10	33 ± 11	33 ± 11	32 ± 9	0.14	0.08	0.12	0.66
HDL size, nm	7.6 ± 0.4	7.13 ± 0.5	7.16 ± 0.4	7.5 ± 0.4	0.6	0.003	0.001	0.11
Apo A, mg/dL	121 ± 22	121 ± 30	126 ± 31	121 ± 23	0.85	0.27	0.93	0.48
Apo B, mg/dL	107 ± 20	100 ± 25	104 ± 26	110 ± 23	0.25	0.06	0.15	0.15
Lp(a), mg/dL	20 ± 18	16 ± 14	20 ± 17	17 ± 13	0.19	0.18	0.81	0.11
Direct bilirubin, mg/dL	0.08 ± 0.05	0.12 ± 0.07	0.13 ± 0.08	0.08 ± 0.06	0.67	0.02	0.047	0.96
Indirect bilirubin, mg/dL	0.47 ± 0.26	0.46 ± 0.26	0.47 ± 0.27	0.43 ± 0.19	0.33	0.32	0.79	0.75
Glucose, mg/dL	84 ± 9	94 ± 16	92 ± 15	87 ± 11	0.36	0.02	0.01	0.26
CRP, mg/L	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.6	0.34	0.13	0.32	0.15
FMD, %	8.5 ± 2.9	12.2 ± 3.9	12.1 ± 3.5	9.1 ± 2.8	0.2	0.004	0.002	0.96

Data are presented as Mean (SD). ERN= extended-release niacin; LRP= laropiprant.

**Figure 1.** Study design





## **CONCLUSÕES**

Este estudo demonstrou que a terapia com niacina em curto prazo (7 dias) em indivíduos com HDL-C baixo pode:

- Melhorar a função endotelial.
- Reduzir a concentração plasmática de triglicérides.
- Reduzir o tamanho das partículas da HDL.
- Aumentar as concentrações plasmáticas de bilirrubina direta.
- Aumentar as concentrações plasmáticas de glicose.
- Esses efeitos são perdidos após uma semana de suspensão do fármaco.
- A niacina pode ser considerada um fármaco candidato para estudos em doenças associadas a estresse oxidativo agudo como infarto do miocárdio.

## REFERÊNCIAS

1. Quintão E. C. R. NER, Passarelli M. . Lípidos: do metabolismo à aterosclerose 2011; 1
2. Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW, Jr., Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci.* 2009;5(5):474-88.
3. Goldberg IJ, Eckel RH, McPherson R. Triglycerides and heart disease: still a hypothesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Aug;31(8):1716-25.
4. Jameson JL. *Harrison's Endocrinology.* 2 ed 2010.
5. Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 2001 Sep;108(6):779-84.
6. Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S195-200.
7. Lowenstein CJ, Cameron SJ. High-density lipoprotein metabolism and endothelial function. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010 Apr;17(2):166-70.
8. Rosenson RS, Brewer HB, Jr., Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation.* 2012 Apr 17;125(15):1905-19.
9. Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1226-9.
10. Verdier C, Martinez LO, Ferrieres J, Elbaz M, Genoux A, Perret B. Targeting high-density lipoproteins: update on a promising therapy. *Arch Cardiovasc Dis.* 2013 Nov;106(11):601-11.
11. Rye KA, Barter PJ. Cardioprotective functions of HDLs. *J Lipid Res.* 2014 Feb;55(2):168-79.
12. Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis.* 1999 Jun;144(2):285-301.
13. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta.* 2010 Dec 14;411(23-24):1875-82.
14. Soran H, Hama S, Yadav R, Durrington PN. HDL functionality. *Curr Opin Lipidol.* 2012 Aug;23(4):353-66.
15. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004 Oct 15;95(8):764-72.

16. Matsunaga T, Hokari S, Koyama I, Harada T, Komoda T. NF-kappa B activation in endothelial cells treated with oxidized high-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Mar 28;303(1):313-9.
17. Saemann MD, Poglitsch M, Kopecky C, Haidinger M, Horl WH, Weichhart T. The versatility of HDL: a crucial anti-inflammatory regulator. *Eur J Clin Invest*. 2010 Dec;40(12):1131-43.
18. Patel S, Puranik R, Nakhla S, Lundman P, Stocker R, Wang XS, et al. Acute hypertriglyceridaemia in humans increases the triglyceride content and decreases the anti-inflammatory capacity of high density lipoproteins. *Atherosclerosis*. 2009 Jun;204(2):424-8.
19. Al-Jarallah A, Trigatti BL. A role for the scavenger receptor, class B type I in high density lipoprotein dependent activation of cellular signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec;1801(12):1239-48.
20. Asmis R. "Topical" HDL for vein grafts: a new solution to an old problem? *Atherosclerosis*. 2011 Feb;214(2):259-60.
21. Feng Y, van Eck M, Van Craeyveld E, Jacobs F, Carlier V, Van Linthout S, et al. Critical role of scavenger receptor-BI-expressing bone marrow-derived endothelial progenitor cells in the attenuation of allograft vasculopathy after human apo A-I transfer. *Blood*. 2009 Jan 15;113(3):755-64.
22. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:235-76.
23. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*. 2001 Jul;7(7):853-7.
24. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*. 2004 Feb;113(4):569-81.
25. Igarashi J, Michel T. S1P and eNOS regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep;1781(9):489-95.
26. Matsuo Y, Miura S, Kawamura A, Uehara Y, Rye KA, Saku K. Newly developed reconstituted high-density lipoprotein containing sphingosine-1-phosphate induces endothelial tube formation. *Atherosclerosis*. 2007 Sep;194(1):159-68.
27. Shimizu T, Nakazawa T, Cho A, Dastvan F, Shilling D, Daum G, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 2 negatively regulates neointimal formation in mouse arteries. *Circ Res*. 2007 Nov 9;101(10):995-1000.

28. Gonzalez-Diez M, Rodriguez C, Badimon L, Martinez-Gonzalez J. Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: effect of simvastatin. *Thromb Haemost.* 2008 Jul;100(1):119-26.
29. Li D, Zhang Y, Ma J, Ling W, Xia M. Adenosine monophosphate activated protein kinase regulates ABCG1-mediated oxysterol efflux from endothelial cells and protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jul;30(7):1354-62.
30. Terasaka N, Westerterp M, Koetsveld J, Fernandez-Hernando C, Yvan-Charvet L, Wang N, et al. ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Nov;30(11):2219-25.
31. Besler C HK, Rohrer L, Yonekawa K, Doerries C, Manes C, Muller M, Templin C, Corti R, Maier W et al. Mechanisms leading to impaired endothelial-vasoprotective properties of high density lipoprotein (HDL) in patients with coronary disease (CAD). *Circulation.* 2009;120 (Supl.): S1009.
32. Gong M, Wilson M, Kelly T, Su W, Dressman J, Kincer J, et al. HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner. *J Clin Invest.* 2003 May;111(10):1579-87.
33. Badeau RM, Metso J, Wahala K, Tikkanen MJ, Jauhiainen M. Human macrophage cholesterol efflux potential is enhanced by HDL-associated 17beta-estradiol fatty acyl esters. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009 Aug;116(1-2):44-9.
34. Paatela H, Mervaala E, Deb S, Wahala K, Tikkanen MJ. HDL-associated dehydroepiandrosterone fatty acyl esters: enhancement of vasodilatory effect of HDL. *Steroids.* 2009 Oct;74(10-11):814-8.
35. Ford MA, McConnell JP, Lavi S, Rihal CS, Prasad A, Sandhu GS, et al. Coronary artery endothelial dysfunction is positively correlated with low density lipoprotein and inversely correlated with high density lipoprotein subclass particles measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Atherosclerosis.* 2009 Nov;207(1):111-5.
36. Drew BG, Fidge NH, Gallon-Beaumier G, Kemp BE, Kingwell BA. High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 4;101(18):6999-7004.
37. Camont L, Lhomme M, Rached F, Le Goff W, Negre-Salvayre A, Salvayre R, et al. Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Dec;33(12):2715-23.

38. Sattler K, Levkau B. Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovasc Res.* 2009 May 1;82(2):201-11.
39. Oravec S, Demuth K, Myara I, Hornyk A. The effect of high density lipoprotein subfractions on endothelial eicosanoid secretion. *Thromb Res.* 1998 Oct 15;92(2):65-71.
40. Terasaka N, Yu S, Yvan-Charvet L, Wang N, Mzhavia N, Langlois R, et al. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J Clin Invest.* 2008 Nov;118(11):3701-13.
41. Xavier H. T. IMC, Faria Neto J. R., Assad M. H., Rocha V. Z., Sposito A. C., Fonseca F. A., dos Santos J. E., Santos R. D., Bertolami M. C., Faludi A. A., Martinez T. L. R., Diament J., Guimarães A., Forti N. A., Moriguchi E., Chagas A. C. P., Coelho O. R., Ramires J. A. F.; V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol.* 2013.
42. Parra ES., Zago V.H.S. ; Panzoldo, N. B. ; Alexandre, F; Vendrame, F. ; Virginio, V. W. M. ; Vieira, I. C. ; Rodrigues, M. S. D. ; Cassol A ; D'alexandri, F.L.; Castanho, V. ; Nakamura R. ; Baracat, J. ; Danelon, M. R. G; Pozeti, R. C. S. ; Facin, A. C. C. ; Honorio, H. M. S. ; Mesquita, S. C. D. ; Silva, M. J. ; Feres, M. C. ; Nunes, V.S. ; Leança, C.C. ; Nakandakare, E. R. ; Quintão, E. C. R; De faria, E. C. Development of a clinical laboratory data base of hyper and hypo alpha lipoproteins in Campinas-SP and neighboring region. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2013;49:26-33.
43. Subramanian S, Chait A. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1821(5):819-25.
44. Boes E, Coassin S, Kollerits B, Heid IM, Kronenberg F. Genetic-epidemiological evidence on genes associated with HDL cholesterol levels: a systematic in-depth review. *Exp Gerontol.* 2009 Mar;44(3):136-60.
45. Hovingh GK, de Groot E, van der Steeg W, Boekholdt SM, Hutten BA, Kuivenhoven JA, et al. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2005 Apr;16(2):139-45.
46. Singh V, Sharma R, Kumar A, Deedwania P. Low high-density lipoprotein cholesterol: current status and future strategies for management. *Vasc Health Risk Manag.* 2010;6:979-96.
47. Kwiterovich PO, Jr. Diagnosis and management of familial dyslipoproteinemias. *Curr Cardiol Rep.* 2013 Jun;15(6):371.
48. World-Health-Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.

49. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006 Nov;3(11):e442.
50. Dawber TR. *The Framingham Study: The Epidemiology of Atherosclerotic Disease*. [Cambridge, Mass.: Harvard University Press.]. 1980.
51. Keys A, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Djordevic BS, Buzina R, et al. The seven countries study: 2,289 deaths in 15 years. *Prev Med*. 1984 Mar;13(2):141-54.
52. Kazemi-Bajestani SM, Ghayour-Mobarhan M. Concept of Atherosclerosis Velocity: Is It a Better Measure of Cardiovascular Risk? *Iran J Med Sci*. 2013 Sep;38(3):210-20.
53. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):317-25.
54. Jawien J. New insights into immunological aspects of atherosclerosis. *Pol Arch Med Wewn*. 2008 Mar;118(3):127-31.
55. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74.
56. Dessi M, Noce A, Bertucci P, Manca di Villahermosa S, Zenobi R, Castagnola V, et al. Atherosclerosis, Dyslipidemia, and Inflammation: The Significant Role of Polyunsaturated Fatty Acids. *ISRN Inflamm*. 2013;2013:191823.
57. Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, Giakoumi SM, Kypreos KE. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010 Jan;208(1):3-9.
58. Corrado E, Rizzo M, Coppola G, Fattouch K, Novo G, Marturana I, et al. An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2010 Feb;17(1):1-11.
59. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 1;54(23):2129-38.
60. Batlouni M. Endotélio e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8: 328-38.
61. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb 1;23(2):168-75.
62. Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(6):853-76.

63. Dod HS, Bhardwaj R, Sajja V, Weidner G, Hobbs GR, Konat GW, et al. Effect of intensive lifestyle changes on endothelial function and on inflammatory markers of atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2010 Feb 1;105(3):362-7.
64. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009 Mar;73(3):411-8.
65. Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jan;10(1):53-62.
66. Wajchenberg BL. Disfunção Endotelial no Diabetes do Tipo 2. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2002;46, 514-519.
67. Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 2009 Nov;32 Suppl 2:S314-21.
68. Norata GD, Catapano AL. Molecular mechanisms responsible for the antiinflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(2):119-29.
69. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):998-1005.
70. Kaplan M, Aviram M, Hayek T. Oxidative stress and macrophage foam cell formation during diabetes mellitus-induced atherogenesis: role of insulin therapy. *Pharmacol Ther*. 2012 Nov;136(2):175-85.
71. Stoner L, Erickson ML, Young JM, Fryer S, Sabatier MJ, Faulkner J, et al. There's more to flow-mediated dilation than nitric oxide. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(7):589-600.
72. Cassiana R. G. Giribela RG, Valéria Hong, Fernanda M. Consolim-Colombo. Endothelial function and dysfunction: pathophysiology and perspectives for use in research and clinical practice. *Rev Bras Hipertens* 2011;vol.18(1):27-32.
73. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986 Oct 23;315(17):1046-51.
74. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992 Nov 7;340(8828):1111-5.
75. Koller A, Sun D, Kaley G. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ Res*. 1993 Jun;72(6):1276-84.



76. Green DJ, Jones H, Thijssen D, Cable NT, Atkinson G. Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: does nitric oxide matter? *Hypertension*. 2011 Mar;57(3):363-9.
77. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995 Mar 1;91(5):1314-9.
78. Kooijman M, Thijssen DH, de Groot PC, Bleeker MW, van Kuppevelt HJ, Green DJ, et al. Flow-mediated dilatation in the superficial femoral artery is nitric oxide mediated in humans. *J Physiol*. 2008 Feb 15;586(4):1137-45.
79. Bahia L, de Aguiar LG, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. [The endothelium in the metabolic syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Apr;50(2):291-303.
80. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Jan 16;39(2):257-65.
81. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2010 Aug;26(6):631-40.
82. Frick M, Suessenbacher A, Alber HF, Dichtl W, Ulmer H, Pachinger O, et al. Prognostic value of brachial artery endothelial function and wall thickness. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Sep 20;46(6):1006-10.
83. Schroeder S, Enderle MD, Ossen R, Meisner C, Baumbach A, Pfohl M, et al. Noninvasive determination of endothelium-mediated vasodilation as a screening test for coronary artery disease: pilot study to assess the predictive value in comparison with angina pectoris, exercise electrocardiography, and myocardial perfusion imaging. *Am Heart J*. 1999 Oct;138(4 Pt 1):731-9.
84. Giannotti G, Landmesser U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz*. 2007 Oct;32(7):568-72.
85. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32.
86. Bots ML, Westerink J, Rabelink TJ, de Koning EJ. Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response. *Eur Heart J*. 2005 Feb;26(4):363-8.
87. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest*. 2005 Jun;127(6):2254-63.

88. Lanska DJ. Chapter 30: historical aspects of the major neurological vitamin deficiency disorders: the water-soluble B vitamins. *Handb Clin Neurol*. 2010;95:445-76.
89. Lanska DJ. The discovery of niacin, biotin, and pantothenic acid. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(3):246-53.
90. Altschul R, Hoffer A, Stephen JD. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Arch Biochem Biophys*. 1955 Feb;54(2):558-9.
91. Carlson LA. Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J Intern Med*. 2005 Aug;258(2):94-114.
92. Elvehjem CA, Madden RJ, Strong FM, Wolley DW. The isolation and identification of the anti-black tongue factor. 1937. *J Biol Chem*. 2002 Aug 23;277(34):e22.
93. Clofibrate and niacin in coronary heart disease. *JAMA*. 1975 Jan 27;231(4):360-81.
94. Tunaru S, Kero J, Schaub A, Wufka C, Blaukat A, Pfeffer K, et al. PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med*. 2003 Mar;9(3):352-5.
95. Soga T, Kamohara M, Takasaki J, Matsumoto S, Saito T, Ohishi T, et al. Molecular identification of nicotinic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Mar 28;303(1):364-9.
96. Wise A, Foord SM, Fraser NJ, Barnes AA, Elshourbagy N, Eilert M, et al. Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):9869-74.
97. Offermanns S, Colletti SL, Lovenberg TW, Semple G, Wise A, AP IJ. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXII: Nomenclature and Classification of Hydroxy-carboxylic Acid Receptors (GPR81, GPR109A, and GPR109B). *Pharmacol Rev*. 2011 Jun;63(2):269-90.
98. Lukasova M, Hanson J, Tunaru S, Offermanns S. Nicotinic acid (niacin): new lipid-independent mechanisms of action and therapeutic potentials. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 Dec;32(12):700-7.
99. Plaisance EP, Lukasova M, Offermanns S, Zhang Y, Cao G, Judd RL. Niacin stimulates adiponectin secretion through the GPR109A receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Mar;296(3):E549-58.
100. Maciejewski-Lenoir D, Richman JG, Hakak Y, Gaidarov I, Behan DP, Connolly DT. Langerhans cells release prostaglandin D2 in response to nicotinic acid. *J Invest Dermatol*. 2006 Dec;126(12):2637-46.

101. Kostylina G, Simon D, Fey MF, Yousefi S, Simon HU. Neutrophil apoptosis mediated by nicotinic acid receptors (GPR109A). *Cell Death Differ.* 2008 Jan;15(1):134-42.
102. Lukasova M, Malaval C, Gille A, Kero J, Offermanns S. Nicotinic acid inhibits progression of atherosclerosis in mice through its receptor GPR109A expressed by immune cells. *J Clin Invest.* 2011 Mar;121(3):1163-73.
103. Knowles HJ, te Poele RH, Workman P, Harris AL. Niacin induces PPARgamma expression and transcriptional activation in macrophages via HM74 and HM74a-mediated induction of prostaglandin synthesis pathways. *Biochem Pharmacol.* 2006 Feb 28;71(5):646-56.
104. Hanson J, Gille A, Zwykiel S, Lukasova M, Clausen BE, Ahmed K, et al. Nicotinic acid- and monomethyl fumarate-induced flushing involves GPR109A expressed by keratinocytes and COX-2-dependent prostanoid formation in mice. *J Clin Invest.* 2010 Aug;120(8):2910-9.
105. Singh N, Thangaraju M, Prasad PD, Martin PM, Lambert NA, Boettger T, et al. Blockade of dendritic cell development by bacterial fermentation products butyrate and propionate through a transporter (Slc5a8)-dependent inhibition of histone deacetylases. *J Biol Chem.* 2010 Sep 3;285(36):27601-8.
106. Martin PM, Ananth S, Cresci G, Roon P, Smith S, Ganapathy V. Expression and localization of GPR109A (PUMA-G/HM74A) mRNA and protein in mammalian retinal pigment epithelium. *Mol Vis.* 2009;15:362-72.
107. Ruparel N, Digby JE, Choudhury RP. Effects of niacin on atherosclerosis and vascular function. *Curr Opin Cardiol.* 2011 Jan;26(1):66-70.
108. Santos RD. [Pharmacology of niacin or nicotinic acid]. *Arq Bras Cardiol.* 2005 Oct;85 Suppl 5:17-9.
109. Albers JJ, Slee A, O'Brien KD, Robinson JG, Kashyap ML, Kwiterovich PO, Jr., et al. Relationship of Apolipoproteins A-1 and B, and Lipoprotein(a) to Cardiovascular Outcomes: The AIM-HIGH Trial (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglyceride and Impact on Global Health Outcomes). *J Am Coll Cardiol.* 2013 Oct 22;62(17):1575-9.
110. Lauring B, Taggart AK, Tata JR, Dunbar R, Caro L, Cheng K, et al. Niacin lipid efficacy is independent of both the niacin receptor GPR109A and free fatty acid suppression. *Sci Transl Med.* 2012 Aug 22;4(148):148ra15.
111. Kamanna VS, Ganji SH, Kashyap ML. Recent advances in niacin and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2013 Jun;24(3):239-45.
112. Ganji SH, Qin S, Zhang L, Kamanna VS, Kashyap ML. Niacin inhibits vascular oxidative stress, redox-sensitive genes, and monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2009 Jan;202(1):68-75.

113. Digby JE, Martinez F, Jefferson A, Ruparelia N, Chai J, Wamil M, et al. Anti-inflammatory effects of nicotinic acid in human monocytes are mediated by GPR109A dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Mar;32(3):669-76.
114. Wu BJ, Yan L, Charlton F, Witting P, Barter PJ, Rye KA. Evidence that niacin inhibits acute vascular inflammation and improves endothelial dysfunction independent of changes in plasma lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 May;30(5):968-75.
115. Tavintharan S, Lim SC, Sum CF. Effects of niacin on cell adhesion and early atherogenesis: biochemical and functional findings in endothelial cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009 Mar;104(3):206-10.
116. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011 Jan 13;364(2):127-35.
117. Kashyap ML. Basic considerations in the reversal of atherosclerosis: significance of high-density lipoprotein in stimulating reverse cholesterol transport. *Am J Cardiol.* 1989 May 2;63(16):56H-9H.
118. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Oct 1;23(10):1881-8.
119. Stocker R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal.* 2004 Oct;6(5):841-9.
120. Wu BJ, Chen K, Barter PJ, Rye KA. Niacin inhibits vascular inflammation via the induction of heme oxygenase-1. *Circulation.* 2012 Jan 3;125(1):150-8.
121. Knopp RH, Retzlaff BM, Fish B, Dowdy A, Twaddell B, Nguyen T, et al. The SLIM Study: Slo-Niacin(R) and Atorvastatin Treatment of Lipoproteins and Inflammatory Markers in Combined Hyperlipidemia. *J Clin Lipidol.* 2009;3(3):167-78.
122. Bregar U, Jug B, Keber I, Cevc M, Sebestjen M. Extended-release niacin/laropirant improves endothelial function in patients after myocardial infarction. *Heart Vessels.* 2013 May 28.
123. Sood A, Arora R. Mechanisms of flushing due to niacin and abolition of these effects. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2009 Nov;11(11):685-9.
124. Kamanna VS, Ganji SH, Kashyap ML. The mechanism and mitigation of niacin-induced flushing. *Int J Clin Pract.* 2009 Sep;63(9):1369-77.
125. Maccubbin D, Koren MJ, Davidson M, Gavish D, Pasternak RC, Macdonell G, et al. Flushing profile of extended-release niacin/laropirant versus gradually titrated

- niacin extended-release in patients with dyslipidemia with and without ischemic cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2009 Jul 1;104(1):74-81.
126. Parhofer KG. Review of extended-release niacin/laropiprant fixed combination in the treatment of mixed dyslipidemia and primary hypercholesterolemia. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5:901-8.
  127. Goldberg RB, Jacobson TA. Effects of niacin on glucose control in patients with dyslipidemia. *Mayo Clin Proc.* 2008 Apr;83(4):470-8.
  128. Gibbons LW, Gonzalez V, Gordon N, Grundy S. The prevalence of side effects with regular and sustained-release nicotinic acid. *Am J Med.* 1995 Oct;99(4):378-85.
  129. Grundy SM, Vega GL, McGovern ME, Tulloch BR, Kendall DM, Fitz-Patrick D, et al. Efficacy, safety, and tolerability of once-daily niacin for the treatment of dyslipidemia associated with type 2 diabetes: results of the assessment of diabetes control and evaluation of the efficacy of niaspan trial. *Arch Intern Med.* 2002 Jul 22;162(14):1568-76.
  130. McKenney J. New perspectives on the use of niacin in the treatment of lipid disorders. *Arch Intern Med.* 2004 Apr 12;164(7):697-705.
  131. Usman MH, Qamar A, Gadi R, Lilly S, Goel H, Hampson J, et al. Extended-release niacin acutely suppresses postprandial triglyceridemia. *Am J Med.* 2012 Oct;125(10):1026-35.
  132. Plaisance EP, Mestek ML, Mahurin AJ, Taylor JK, Moncada-Jimenez J, Grandjean PW. Postprandial triglyceride responses to aerobic exercise and extended-release niacin. *Am J Clin Nutr.* 2008 Jul;88(1):30-7.
  133. Canner PL, Berge KG, Wenger NK, Stamler J, Friedman L, Prineas RJ, et al. Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. *J Am Coll Cardiol.* 1986 Dec;8(6):1245-55.
  134. Knopp RH. Evaluating niacin in its various forms. *Am J Cardiol.* 2000 Dec 21;86(12A):51L-6L.
  135. Taylor AJ, Sullenberger LE, Lee HJ, Lee JK, Grace KA. Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. *Circulation.* 2004 Dec 7;110(23):3512-7.
  136. AIM-HIGH-Investigators. The role of niacin in raising high-density lipoprotein cholesterol to reduce cardiovascular events in patients with atherosclerotic cardiovascular disease and optimally treated low-density lipoprotein cholesterol Rationale and study design. The Atherothrombosis Intervention in Metabolic syndrome with low HDL/high triglycerides: Impact on Global Health outcomes (AIM-HIGH). *Am Heart J.* 2011 Mar;161(3):471-7 e2.

137. HPS2-THRIVE Collaborative Group. HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. *Eur Heart J*. 2013 May;34(17):1279-91.
138. Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med*. 2011 Dec 15;365(24):2255-67.
139. Boden WE, Sidhu MS, Toth PP. The Therapeutic Role of Niacin in Dyslipidemia Management. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2013 Dec 20.
140. Michos ED, Sibley CT, Baer JT, Blaha MJ, Blumenthal RS. Niacin and statin combination therapy for atherosclerosis regression and prevention of cardiovascular disease events: reconciling the AIM-HIGH (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcomes) trial with previous surrogate endpoint trials. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Jun 5;59(23):2058-64.
141. Guyton JR, Slee AE, Anderson T, Fleg JL, Goldberg RB, Kashyap ML, et al. Relationship of Lipoproteins to Cardiovascular Events: The AIM-HIGH Trial (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides and Impact on Global Health Outcomes). *J Am Coll Cardiol*. 2013 Oct 22;62(17):1580-4.
142. Gielen S, Landmesser U. The Year in Cardiology 2013: cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J*. 2014 Feb;35(5):307-12.
143. HPS2-THRIVE-Collaborative-Group. Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events (HPS2-THRIVE). 2012; Available from: <http://www.thrivestudy.org/>
144. Gielen S, Landmesser U. The Year in Cardiology 2013: cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J*. 2014 Jan 2.